

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

УТКИН ДМИТРИЙ ОЛЕГОВИЧ

**КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ГИПЕРМЕТИЛИРОВАННЫХ ГЕНОВ
МИКРОРНК И РАСТВОРИМЫХ ФОРМ РЕЦЕПТОРА И ЛИГАНДА
КОНТРОЛЬНОЙ ТОЧКИ ИММУНИТЕТА PD-1/PD-L1 ПРИ РАКЕ
ЯИЧНИКОВ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН

Кушлинский Николай Евгеньевич

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|-------|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 5 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... | 16-49 |
| 1.1. Общие сведения о раке яичников..... | 16 |
| 1.1.1. Эпидемиология рака яичников..... | 16 |
| 1.1.2. Классификация рака яичников..... | 16 |
| 1.1.3. Диагностика рака яичников..... | 19 |
| 1.1.4. Лечение рака яичников..... | 20 |
| 1.2. МикроРНК в патогенезе рака яичников..... | 28 |
| 1.2.1. Общие сведения о микроРНК..... | 28 |
| 1.2.2. Экспрессия и функция микроРНК при раке яичников..... | 30 |
| 1.2.3. Роль метилирования в регуляции микроРНК..... | 35 |
| 1.2.4. Возможности микроРНК как диагностических маркеров рака яичников..... | 37 |
| 1.2.5. Прогностическая роль микроРНК при раке яичников..... | 39 |
| 1.3. Контрольная точка иммунитета PD-1/PD-L1..... | 40 |
| 1.3.1. Общие сведения о PD-1 и PD-L1..... | 40 |
| 1.3.2. Экспрессия PD-1 и PD-L1 при онкологических заболеваниях..... | 43 |
| 1.3.3. Ингибирование PD-1 и PD-L1 в лечении онкологических заболеваний..... | 45 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 50-59 |
| 2.1. Характеристика основных групп обследованных женщин с опухолями яичников и женщин группы контроля..... | 50 |
| 2.2. Характеристика больных злокачественными опухолями яичников..... | 52 |
| 2.3. Лечение больных злокачественными опухолями яичников..... | 55 |
| 2.4. Клинико-лабораторные методы обследования..... | 57 |
| ГЛАВА 3. СОБСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 60-89 |
| 3.1. Содержание маркера sPD-1 и его лиганда sPD-L1 в плазме крови | |

| | |
|--|---------|
| больных опухолями яичников разных групп и в контроле..... | 60 |
| 3.2. Связь sPD-1 и sPD-L1 плазмы крови с данными анамнеза обследованных больных и группы контроля..... | 64 |
| 3.3. Связь концентраций sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных раком яичников с основными клиническими характеристиками заболевания..... | 69 |
| ГЛАВА 4. УРОВНИ МЕТИЛИРОВАНИЯ И ЭКСПРЕССИИ ГРУППЫ ГЕНОВ микроРНК В ТКАНИ ОПУХОЛИ И МЕТАСТАЗОВ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ..... | 90-115 |
| 4.1. Уровни метилирования генов микроРНК в ткани опухоли больных раком яичников..... | 90 |
| 4.2. Связь метилирования маркеров микроРНК в тканях больных раком яичников с клиническими факторами заболевания..... | 99 |
| 4.3. Уровень экспрессии генов микроРНК у больных раком яичников..... | 109 |
| 4.4. Связь показателей метилирования и экспрессии генов микроРНК с концентрациями плазменных маркеров sPD-1 и sPD-L1 у больных раком яичников..... | 111 |
| 4.5. Связь уровней экспрессии генов микроРНК с прогрессией заболевания..... | 114 |
| ГЛАВА 5. ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ ЯИЧНИКОВ..... | 116-135 |
| 5.1. Безрецидивная выживаемость больных злокачественными опухолями яичников в зависимости от клинических факторов..... | 116 |
| 5.2. Безрецидивная выживаемость больных злокачественными опухолями яичников с учетом концентраций sPD-1 и sPD-L1..... | 121 |
| 5.3. Связь уровней метилирования маркеров микроРНК с показателями безрецидивной выживаемости у больных злокачественными опухолями яичников..... | 129 |

| | | | |
|--------------------------------|---|------------|------------|
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | И | ОБСУЖДЕНИЕ | ПОЛУЧЕННЫХ |
| РЕЗУЛЬТАТОВ..... | | | 136 |
| ВЫВОДЫ..... | | | 142 |
| ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ..... | | | 145 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | | | 146 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | | | 148 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Рак яичников (РЯ) – представляет группу крайне агрессивных опухолей женской репродуктивной системы, характеризуется трудностями ранней диагностики, частым выявлением опухоли с признаками диссеминации в третьей стадии заболевания и быстрым метастазированием. В Российской Федерации в структуре онкологических заболеваний среди женского населения РЯ занимает 9 место. Кроме того, РЯ характеризуется наиболее высокими показателями летальности среди всех злокачественных новообразований женской репродуктивной системы, ежегодно в России регистрируется более 8000 летальных исходов. По данным в структуре онкологической смертности среди женщин РЯ занимает 8 место [3, 4].

С целью более углубленного понимания основ определенных этапов развития новообразований яичников в условиях свершившейся опухолевой трансформации клеток, важно изучение базовых биологических характеристик опухоли, а именно, конкретных молекул, связанных с механизмами регуляции скорости роста, пролиферативной активности, апоптоза, неоангиогенеза, а при РЯ – инвазивной способности и метастазирования. Все вышеуказанные биологические характеристики опухолевого процесса отражают не только «поведение» новообразования и его клинические проявления, но и связаны с ответом опухоли на терапию [18].

Известно, что в метастазирование РЯ вовлечено множество взаимосвязанных биологических процессов – повышение миграционной активности раковых клеток, эпителиально-мезенхимальный переход, разрушение внеклеточного матрикса, образование сфероидов, апоптоз, аутофагия, ангиогенез, формирование метастазов и появление асцита [1, 15]. В обеспечении этих процессов важную роль играют регуляторные микроРНК [1].

МикроРНК играют важную роль во многих фундаментальных биологических процессах, связанных с развитием и прогрессией злокачественных новообразований. Они могут подавлять экспрессию как драйверных онкогенов, так и супрессоров опухолевого роста, и, соответственно, могут функционировать и как супрессоры, и как онкогены [119]. Получены данные о роли микроРНК и регулируемых ими генов-мишеней в патогенезе и метастазировании РЯ, причем они проявляют как про-метастатические, так и анти-метастатические свойства [101]. Экспрессия генов супрессорных и/или анти-метастатических микроРНК в опухолях может снижаться посредством метилирования CpG-островков (5'-цитозин-фосфат-гуанин-3') промоторных районов. Причем доля генов микроРНК, «выключенных» метилированием, выше, чем обычных генов, кодирующих белки [103, 117, 143]. В связи с этим гиперметилированные гены микроРНК могут служить высокоспецифичными и чувствительными диагностическими и прогностическими маркерами РЯ [130; 174].

В последнее десятилетие значительный интерес к проблеме диагностики, лечения и оценки прогноза РЯ связывают с возможностью иммунотерапевтического воздействия на опухоль и ее метастазы, а именно, целенаправленное подавление активности одного из сигнальных путей, т.н. «контрольных точек иммунитета» - PD-1/PD-L1. Основные компоненты этой контрольной точки – рецептор программируемой гибели клетки 1 типа PD-1 (programmed cell death protein 1) и его лиганд PD-L1 рассматривают как молекулярные маркеры общего прогноза течения онкологических заболеваний и как маркеры выживаемости пациенток [2]. В исследованиях последних лет показана положительная взаимосвязь экспрессии рецептора программируемой гибели клетки PD-1 и/или его лиганда PD-L1 при РЯ с распространенностью и степенью злокачественности опухоли [6].

Пристальный интерес у исследователей вызывает изучение растворимых форм рецептора PD-1 (sPD-1) и его лиганда (sPD-L1), обнаруженных относительно недавно в периферической крови, в том числе, и при некоторых

онкологических заболеваниях. В литературе представлены единичные научные работы, в которых исследовали клиническую значимость и связь контрольных точек иммунитета у больных РЯ с экспрессией генов микроРНК и совсем не изучена их связь с маркерами гиперметилирования генов микроРНК [7]. В связи с этим полагаем, что настоящее исследование своевременно и актуально.

Цель исследования

Изучить клиническую значимость метилирования и экспрессии группы генов микроРНК (*MIR-124a-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125b-1*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-132*, *MIR-137*, *MIR-203a*, *MIR-34b*, *MIR-34c*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*) и их ассоциации с растворимыми формами рецептора программируемой гибели клетки sPD-1 и его лиганда sPD-L1 в целях повышения эффективности диагностики и оценки прогноза рака яичников.

Задачи исследования

1. Провести анализ концентрации растворимых форм рецептора программируемой гибели клеток sPD-1 и его лиганда sPD-L1 контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в плазме крови больных раком яичников до лечения и сравнить их уровни у здоровых доноров группы контроля.

2. Оценить изменения уровня метилирования и экспрессии группы генов микроРНК (*MIR-124a-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125b-1*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-132*, *MIR-137*, *MIR-203a*, *MIR-34b*, *MIR-34c*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*) в опухолях и перитонеальных метастазах больных раком яичников с контрольной группой.

3. Изучить связь концентраций sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови и уровней метилирования и экспрессии группы генов микроРНК (*MIR-124a-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125b-1*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-132*, *MIR-137*, *MIR-203a*, *MIR-34b*, *MIR-34c*,

MIR-375, MIR-9-1, MIR-9-3, MIR-339) в опухолях и перитонеальных метастазах больных раком яичников с основными клинико-морфологическими характеристиками заболевания (стадия процесса, морфологический вариант рака яичников, степень дифференцировки опухоли).

4. Исследовать связь уровня метилирования и экспрессии группы генов микроРНК в опухолях и перитонеальных метастазах больных раком яичников и их ассоциации с содержанием растворимых форм рецептора sPD-1 и его лиганда sPD-L1 в плазме крови пациенток.

5. Выявить связь уровней метилирования и экспрессии группы генов микроРНК в опухолях и перитонеальных метастазах с концентрацией sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных раком яичников с длительностью безрецидивной выживаемости, для выделения клинически значимых критериев диагностики и оценки прогноза рака яичников.

Научная новизна

В ходе выполнения диссертационной работы получены оригинальные результаты по исследованию растворимых форм контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 (sPD-1, sPD-L1), уровней метилирования и экспрессии генов микроРНК (*MIR-124a-2, MIR-124-3, MIR-125b-1, MIR-127, MIR-129-2, MIR-132, MIR-137, MIR-203a, MIR-34b, MIR-34c, MIR-375, MIR-9-1, MIR-9-3, MIR-339*) в ткани опухоли и метастазов, позволяющие в комплексе с клиническими и морфологическими данными повысить эффективность диагностики и оценки прогноза заболевания у больных новообразованиями яичников. Обнаружены статистически значимые отличия концентраций рецептора sPD-1 и его лиганда sPD-L1 в плазме крови здоровых женщин и больных доброкачественными опухолями, различия между пограничными, доброкачественными и злокачественными опухолями яичников не значимы. Уровни sPD-1 у больных РЯ не связаны с данными анамнеза, гистологическим строением опухоли, наличием

опухолевых клеток в смывах из брюшной полости, уровнями маркеров СА-125 и НЕ-4, не зависели от объема асцита, но статистически значимо возрастают при наличии диссеминатов опухоли по брюшине размером более 1 см.

Доказано, что концентрации sPD-L1 в плазме крови статистически значимо отражали стадию, критерии N и M системы TNM, высокосignificantly выше при наличии асцита и опухолевых клеток в смывах из брюшной полости, связаны прямой корреляционной зависимостью с уровнями опухолевых маркеров СА-125 и НЕ-4 в крови, но не с концентрациями рецептора sPD-1.

Впервые у больных РЯ выявлено повышение уровня метилирования 11 из 14 генов микроРНК в первичной опухоли; показана ассоциация гиперметилирования генов *MIR-124a-2*, *MIR-125b-1*, *MIR-127* с прогрессированием новообразований яичников до РЯ и по стадиям заболевания. Дальнейшее повышение уровня метилирования генов микроРНК *MIR-339* и *MIR-203* отмечено в метастазах РЯ. При этом показана согласованность между процессами метилирования для попарных сочетаний генов микроРНК; в опухолях значимые корреляции отмечены для 29 попарных сочетаний генов микроРНК, а в метастазах – для 14 попарных сочетаний генов микроРНК; высоко значимые корреляции в опухолях выявлены для 3 пар генов микроРНК (*MIR-34b* и *MIR-34c*; *MIR-129-2* и *MIR132*; *MIR-124a-2* и *MIR-127*), в метастазах – для 4 пар (*MIR-34b* и *MIR-34c*; *MIR-9-1* и *MIR-34b*; *MIR-129-2* и *MIR-132*). Эти данные свидетельствуют о возможном участии таких микроРНК в общих биологических процессах.

Обнаружена связь метилирования генов микроРНК в опухолях больных РЯ с клиническими факторами заболевания: для 9 генов (*MIR-124a-2*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-34b*, *MIR-34c*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*) – со стадией; для 6 генов (*MIR-124a-2*, *MIR-129-2*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*) – с наличием метастазов в большом сальнике; гена *MIR132* – с диссеминацией по брюшине; гена *MIR-375* – со снижением степени дифференцировки новообразования.

Впервые показано, что уровни метилирования генов микроРНК *MIR-124a-2*,

MIR-34b, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339* в опухоли связаны значимой линейной зависимостью с концентрациями sPD-L1 в плазме крови больных РЯ, наиболее тесной с *MIR-124a-2*. Многофакторный анализ показал, что стадия заболевания и уровни sPD-1 следует считать независимыми факторами прогноза при РЯ.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные биохимические данные с учетом клинико-морфологических характеристик РЯ позволили утверждать объективную значимость исследованных маркеров в диагностике и оценке прогноза заболевания.

Показано, что при однофакторном анализе безрецидивную выживаемость больных РЯ статистически значимо определяли: дифференцировка опухоли, стадия заболевания, наличие метастазов в большом сальнике при размерах менее 2 см, диссеминация по брюшине при размере диссеминатов более 1 см, наличии асцита и уровни маркера HE-4. Факторы анамнеза больных РЯ не определяли сроки развития рецидива. Значимо худшая безрецидивная выживаемость отмечена при не оптимальной операции. Многофакторный анализ показал, что стадия заболевания и уровни sPD-1 следует считать независимыми факторами прогноза при РЯ.

Впервые показано, что исходные уровни растворимых форм контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 рецептор программируемой гибели клеток sPD-1 и его лиганд sPD-L1 в плазме крови больных РЯ связаны с основными клинико-морфологическими характеристиками новообразования, что позволяет использовать показатели указанных опухолевых маркеров при обследовании этой категории пациенток с целью оценки прогноза заболевания.

По результатам исследования уровней рецептора sPD-1 и его лиганда sPD-L1 в плазме крови можно предсказать с высокой долей вероятности длительность безрецидивной выживаемости у больных РЯ. Концентрации sPD-1 в плазме крови более 50 пг/мл, sPD-L1 более 22 пг/мл, уровни метилирования генов микроРНК

MIR-9-1, *MIR-124a-2*, *MIR-34b* в опухоли статистически значимо связаны с низкими показателями 3-летней безрецидивной выживаемости больных РЯ.

Методология и методы исследования

Методологической основой диссертационной работы является комплексное исследование содержания sPD-1, sPD-L1 в плазме крови, уровней метилирования и экспрессии 14 генов микроРНК (*MIR-124a-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125b-1*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-132*, *MIR-137*, *MIR-203a*, *MIR-34b*, *MIR-34c*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*) в ткани опухоли и перитонеальных метастазов больных раком яичников, а также ассоциации уровня метилирования группы генов микроРНК в опухоли с содержанием sPD-1, sPD-L1 в плазме крови, выполненных высокочувствительными иммуноферментными методами исследования, количественной МС-ПЦР (метилспецифичной полимеразной цепной реакции) и ОТ-ПЦР с детекцией в реальном времени с использованием современного оборудования.

В работе учитывали клинические и морфологические характеристики новообразований яичников на основании анализа общеклинических, рентгенологических и гистологических данных исследования. В диссертационном исследовании проводили статистический анализ показателей общей выживаемости больных первичными раком яичников с учетом изучаемых лабораторных маркеров (уровней метилирования и экспрессии 14 генов микроРНК, sPD-1, sPD-L1).

Положения, выносимые на защиту

1. Концентрации рецептора sPD-1 и его лиганда sPD-L1 в плазме крови больных пограничными и злокачественными опухолями яичников статистически значимо не отличаются от здоровых женщин. Концентрации рецептора sPD-1 и

его лиганда sPD-L1 при РЯ достоверно связаны с основными клинико-морфологическими характеристиками новообразований.

2. У больных РЯ выявлено повышение уровня метилирования 11 из 14 генов микроРНК в опухоли и показана связь метилирования генов микроРНК с клиническими факторами заболевания: для 9 генов (*MIR-124a-2*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-34b*, *MIR-34c*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*) – со стадией; для 6 генов (*MIR-124a-2*, *MIR-129-2*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*) – с наличием метастазов в большом сальнике; гена *MIR-132* – с диссеминацией опухоли по брюшине; гена *MIR-375* – со снижением степени дифференцировки новообразования.

3. Уровни метилирования генов микроРНК *MIR-124a-2*, *MIR-34b*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339* в опухоли связаны значимой линейной зависимостью с концентрациями sPD-L1 в плазме крови больных РЯ. Связь концентраций sPD-L1 с уровнем метилирования изучаемых генов микроРНК в метастазах отсутствовала.

4. Концентрации sPD-1 в плазме крови более 50 пг/мл, sPD-L1 более 22 пг/мл, уровни метилирования генов микроРНК *MIR-9-1*, *MIR-124a-2*, *MIR-34b* в опухоли статистически значимо связаны с низкими показателями 3-летней безрецидивной выживаемости больных РЯ.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Новые положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия, направлению исследований: П.2. Исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии, биофизики и др.); П.3. Разработка и совершенствование программ скрининга и ранней диагностики онкологических заболеваний.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности диссертационного исследования основана на полном соответствии с запланированным дизайном, достаточном количестве обследованных пациентов (образцы крови – 93 больных РЯ, 10 больных – ПОЯ (пограничные опухоли яичников), 22 больных – ДОЯ (доброкачественные опухоли яичников); образцы опухоли – 26 больных РЯ, образцы перитонеальных метастазов – 19 больных РЯ; образцы гистологически неизменной ткани яичников – 15 больных РЯ), использовании современных лабораторных методик, которые полностью соответствуют поставленным цели и задачам.

Работа выполнена в соответствии с общепринятыми этическими и научными принципами. Полученные в ходе исследования данные обработаны с использованием современных методов статистического анализа. Интерпретация и обсуждение полученных результатов выполнены на основании изучения достаточного количества отечественных и зарубежных работ (203 литературных источника).

Выводы и практические рекомендации логичны, подкреплены убедительными фактическими данными, вытекают из результатов проведенных исследований и полностью соответствуют цели и задачам диссертации.

Апробация диссертации состоялась на совместной научной конференции отделений лаборатории биохимических основ фармакологии и опухолевых моделей, лаборатории биологии стромальных клеток опухолей НИИ канцерогенеза и консультативно-диагностического центра ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, состоявшейся «09» июня 2023 года.

Материалы диссертации представлены на: III Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (Москва, 6-8 декабря 2017г.); XII International Congress on Reproductive Medicine (Moscow, January 16-19 2018); XXIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием

«Традиции и новации клинической лабораторной диагностики» (Москва, 20-22 марта 2018 г.); конференции, посвященной памяти советского и российского ученого Гарри Израйлевича Абелева «Опухолевые маркеры: фундаментальные и клинические аспекты» (Горно-Алтайск, 27-29 июня 2018г.); IV Российском Конгрессе лабораторной медицины (Москва, 3-5 октября 2018г.); V Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи 2019» (Санкт-Петербург, 20-23 июня 2019г.); XXVI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Клиническая лаборатория: от аналитики к диагнозу» (Москва, 12-14 мая 2021г.).

Полученные результаты и рекомендации внедрены в практическую деятельность работы Централизованного научно-клинического лабораторного отдела ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Акт внедрения от 18.05.2023г.).

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликованы 13 печатных работ, 9 из них в рецензируемых научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для опубликования основных результатов диссертационных исследований по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 168 страницах машинописного текста и состоит из введения, главы «Материалы и методы исследования», 3 глав собственных результатов исследования, заключения и обсуждения полученных результатов, практических рекомендаций, выводов и списка цитируемой литературы,

включающего 203 источников, из них 15 отечественных и 188 зарубежных.
Работа иллюстрирована 62 таблицами и 33 рисунками.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общие сведения о раке яичников

1.1.1. Эпидемиология рака яичников

Рак яичников представляет собой наиболее агрессивную опухоль среди злокачественных новообразований женской репродуктивной системы. По смертности занимает первое место среди онкогинекологических заболеваний, что связано с его бессимптомным развитием в высоком проценте случаев, вплоть до диссеминированных стадий. Рак яичников является вторым по распространенности злокачественным новообразованием после РМЖ (рак молочной железы) у женщин старше 40 лет, 5-й причиной смерти, связанной с опухолями среди женщин. По состоянию на 2020 год в мире было зарегистрировано около 314 000 новых случаев во всем мире, что соответствует седьмому месту по распространенности рака у женщин. Более 207 000 женщин умерли от РЯ в 2020 году [36, 37, 161, 169, 186].

Прогноз выживаемости для женщин, у которых развился РЯ, напрямую зависит от стадии заболевания на этапе постановки диагноза [55, 93]. Пациентки, у которых диагностирована I стадия РЯ, имеют 5-летнюю выживаемость 89% [57; 181]. У женщин с распространенностью заболевания в пределах малого таза 5-летняя выживаемость снижается примерно до 70%, с диссеминацией по брюшной полости снижается до 40%, а у женщин с отдаленными метастазами – до 20% [176]. За последние 30 лет уровень смертности от РЯ практически не снизился, что связано с трудностью диагностики на ранних стадиях [176].

1.1.2. Классификация рака яичников

Злокачественные опухоли яичников бывают трех основных типов:

эпителиальные (наиболее распространены), герминогенные и опухоли из стромальных компонентов яичника (опухоли из клеток полового тяжа, клеток теки, гранулезных клеток и фиброцитов), причем последние два типа составляют около 5% всех случаев рака [93].

Существует четыре основных гистологических подтипа эпителиального РЯ: серозный, эндометриоидный, муцинозный и светлоклеточный [93].

Серозные опухоли подразделяются на две категории: серозные карциномы высокой степени злокачественности (HGSC) и серозные карциномы низкой степени злокачественности (LGSC) [24, 93]. HGSC составляют от 70 до 80% всех подтипов эпителиального РЯ, в то время как на LGSC приходится менее 5% [33].

Эндометриоидные, муцинозные и светлоклеточные подтипы составляют 10%, 3% и 10% соответственно [156].

Эпителиальные злокачественные новообразования яичников также могут быть разделены на две категории: опухоли типа I и типа II [105, 152, 163]. Считается, что опухоли типа I, которые менее агрессивны, чем опухоли типа II, возникают в результате непрерывных циклов овуляции, эндометриоза. Наличие эндометриоза может увеличивать риск развития РЯ и связано с 5-15% всех случаев эпителиального РЯ [51, 55]. Опухоли II типа чаще связаны с более высокой смертностью [51]. Данные подтипы диагностируются на более поздних стадиях и ассоциированы с генетическими мутациями генов BRCA и p53. Одна из теорий заключается в том, что опухолевые клетки мигрировали из эпителия маточных труб, являющегося источником данного вида рака [121].

Серозные карциномы

Известно, что два типа серозных карцином HGSC и LGSC имеют разные молекулярные профили, клинические проявления и даже прогноз [33]. LGSC имеют более благоприятный прогноз, ожидаемое время общей выживаемости значительно больше по сравнению с HGSC (а также светлоклеточными или муцинозными типами). Кроме того, по сравнению с HGSC, у женщин обычно LGSC диагностируются в более молодом возрасте [83].

LGSC образуются преимущественно в яичниках, в то время как HGSC, в большинстве случаев, образуются в фимбриальном отделе маточных труб с последующим распространением на яичники или брюшину. HGSC связаны с более фатальным прогнозом: более, чем у 85% женщин диагноз рака устанавливается на более поздних стадиях заболевания, а 10-летний уровень смертности составляет 70% [164].

Эндометриоидная карцинома

Считается, что эндометриоидная карцинома возникает на фоне эндометриоза и часто диагностируется на более ранних стадиях, что улучшает прогноз для женщин, страдающих этим гистологическим типом РЯ. Одна из причин этого может заключаться в том, что этот тип рака является более чувствительным к химиотерапии, и в целом лучше поддается лечению [181].

Светлоклеточная карцинома

Светлоклеточные карциномы составляют 10% эпителиальных злокачественных опухолей яичников и аналогично эндометриоидному раку, имеют относительно благоприятный прогноз. Это связано с тем, что они также часто диагностируются на более ранних стадиях. Если диагноз поставлен на поздних стадиях, прогноз по выживаемости не отличается от серозных и эндометриоидных типов РЯ. Частично это связано с меньшей чувствительностью клеток к химиотерапии на основе платины, а также с сопутствующими осложнениями, которые наблюдаются при запущенной стадии (например, гиперкоагуляция и паранеопластическая гиперкальциемия) [58].

Муцинозная карцинома

Наименее распространенным типом эпителиального РЯ являются муцинозные карциномы, которые чаще всего диагностируются на I стадии [152]. Муцинозная гистологическая форма карциномы может иметь вторичную природу в виде метастатического поражения яичников из желудочно-кишечного тракта. В этом аспекте перед началом лечения пациентки должны пройти обследование

желудочно-кишечного тракта, для исключения муцинозной карциномы кишки [58].

1.1.3. Диагностика рака яичников

Обследования для выявления РЯ затруднено ввиду того, что нет четких и специфических симптомов заболевания. Исторически опухолевый антиген СА-125 (углеводный антиген 125) рассматривали в качестве онкомаркера при РЯ. Однако выяснилось, что этому маркеру не хватает специфичности и чувствительности. Многими исследователями было показано, что уровень СА-125 может повышаться при доброкачественных заболеваниях и даже во время беременности, однако остается в норме почти у 50% пациенток, особенно на ранних стадиях РЯ. В последние годы СА-125 рекомендуют в качестве маркера для диагностики и мониторинга РЯ в комплексе с относительно новым маркером белком придатка яичка человека 4 (HE-4).

Как и в случае любого рака, патоморфологический диагноз устанавливают на основании исследования биопсийного материала опухоли. Рак яичников можно диагностировать с помощью биопсии стержневой иглой, при которой ткань аспирируют и затем исследуют на наличие злокачественных клеток. Считают, что данная процедура сопровождается риском метастазирования в переднюю брюшную стенку. Показано, что риск метастазирования снижается за счет использования трансвагинальной биопсии под контролем ультразвукового исследования (УЗИ). Данная методика снижает вероятность метастазирования в области прохождения иглы [198]. Кроме того, возможно выполнение диагностической лапароскопии с целью биопсии опухоли, а также для оценки распространенности опухолевого процесса и определения возможности выполнения циторедуктивной операции.

Стадирование злокачественных опухолей яичников аналогично стадированию других видов рака и классифицируется по стадиям от I до IV с

использованием шкалы Международной федерации гинекологов и акушеров (FIGO), а также системы стадирования Американского объединенного комитета по раку. Следует отметить, что у большинства пациенток на этапе установления и гистологической верификации диагноза уже имеется III стадия заболевания [23].

1.1.4. Лечение рака яичников

Терапия РЯ традиционно представляет собой комбинацию хирургического и химиотерапевтического лечения [12, 24, 93].

Циторедуктивные операции

В лечении РЯ хирургический метод является основным и может использоваться как самостоятельный вариант лечения начальных стадий РЯ, а также совместно с химиотерапией [13, 182].

Основной целью хирургического лечения эпителиальных опухолей яичников является установление точной хирургической стадии и выполнение максимального объема циторедукции [13].

Показано, что после хирургического стадирования, у 30-35% пациенток с I стадией болезни, установленной клинически, выявляются признаки диссеминации опухолевого процесса, что существенно влияет на выбор дальнейшей лечебной тактики и на прогноз заболевания [137].

Согласно рекомендациям FIGO хирургическое стадирование включает в себя диагностическую лапаротомию, экстрафасциальную экстирпацию матки с двухсторонней сальпингоовариэктомией, тазовую и парааортальную лимфодиссекцию, цитологическое исследование асцита и/или смывов из брюшной полости, множественную биопсию брюшины и оментэктомия [147].

В зависимости от объема остаточной опухоли после выполненной циторедуктивной операции предложена классификация циторедуктивных операций.

В Российских и международных рекомендациях по лечению РЯ выделяют

полную, оптимальную и неоптимальную циторедукцию. При оптимальной циторедукции выполняют экстирпацию матки с придатками, удаление большого сальника и видимых проявлений опухолевого процесса с наличием остаточных опухолевых узлов, размером ≤ 10 мм. Неоптимальная циторедукция предусматривает экстирпацию матки с придатками, удаление большого сальника и видимых проявлений опухолевой болезни с остаточными опухолевыми очагами более 10 мм в диаметре. Выполнение полной циторедукции характеризуется отсутствием макроскопически определяемых опухолевых очагов после операции [10].

Однако ряд авторов [9] считают, что критерии оптимальной циторедукции требуют уточнения, поскольку в эту группу попадают пациентки с разной распространенностью процесса, включая единичные остаточные очаги размером до 10 мм, так и с множественными опухолевыми узелками наибольшим размером менее 10 мм.

Оптимальным объемом операции у больных РЯ при I-II стадиях является экстирпация матки с придатками с проведением хирургического стадирования, дополненная тазовой перитонэктомией при II стадии процесса [11].

При одностороннем поражении и гистологической верификации аденокарциномы низкой степени злокачественности (серозная, муцинозная, смешанная, эндометриоидная опухоль) у пациенток молодого возраста возможно выполнение органосохраняющей операции, включающей удаление придатков на стороне поражения, резекцию контрлатерального яичника и оментэктомию [108]. При таком подходе выживаемость не отличается при хирургическом вмешательстве стандартного объема, при этом рецидивы возникают в 10-15% случаев, а беременность наступает у большинства женщин [5, 32].

Современный подход в лечении диссеминированного РЯ включает комбинацию хирургии (циторедуктивные операции) и химиотерапии. До настоящего времени ведутся активные дискуссии в отношении очередности применения последних. Несмотря на то, что рандомизированные исследования не

показали четких преимуществ первичных циторедуктивных операций в сочетании с адьювантной химиотерапией по сравнению с неoadьювантной химиотерапией в сочетании с интервальной операцией, многие крупные онкологические центры предпочитают на первом этапе лечения выполнять экстенсивные хирургические вмешательства, цель которых – достижение полной или оптимальной циторедукции [128].

При этом необходимо помнить, что большие размеры первичной опухоли или остаточные опухоли после первоначальной пробной операцией влияют негативно на последующее химиотерапевтическое лечение [167]. Они могут блокировать перфузию препаратов в область поражения, что может снизить вероятность повреждения клеток, а также увеличить возможность для роста клонов с множественной лекарственной устойчивостью. При распространенном опухолевом процессе на первом этапе лечения целесообразно выполнять диагностическую лапароскопию, чтобы определить потенциальную операбельность пациентки [166].

Химиотерапия

Пациенткам с IA, IB стадиями с карциномами высокой степени злокачественности или светлоклеточным гистологическим типом, а также тем, кому не выполнены процедуры хирургического стадирования, рекомендуется провести 4-6 курсов платиносодержащей химиотерапии [11, 13].

Два крупных рандомизированных клинических исследования продемонстрировали лучшую общую выживаемость для пациенток с распространенным эпителиальным РЯ по схеме паклитаксел-цисплатин, чем при стандартной на тот момент схеме циклофосфамид-цисплатин, при этом средняя общая выживаемость составила 38 против 24 месяцев в исследовании (GOG 111) и 35,6 против 25,8 месяца в исследовании европейской и канадской группы [127, 141]. Затем последовали два других исследования, в которых цисплатин заменили карбоплатином и подтвердили сопоставимую эффективность (медиана общей выживаемости 43,3 против 44,1 и 57,4 против 48,7 месяцев соответственно), но

лучшую переносимость карбоплатина [34, 138].

С конца 1990-х годов было проведено несколько дополнительных исследований, направленных на улучшение общей выживаемости путем добавления третьего препарата, такого как топотекан, эпирубицин или гемцитабин, к стандартной схеме лечения или путем замены паклитаксела на доцетаксел или пегилированный липосомальный доксорубицин. Тем не менее, во всех исследованиях были получены медианы выживаемости от 33 до 61,6 месяцев в зависимости от стадии FIGO и остаточного заболевания после операции [177].

В начале 1990 годов в двух рандомизированных исследованиях III фазы изучалась польза вторичной циторедуктивной операции как части терапии первой линии при поздних стадиях эпителиального РЯ. В исследование EORTC-55865 были включены пациентки с остаточными опухолевыми очагами более 1 см после первичной операции. После трех курсов циклофосфида и цисплатина они были рандомизированы для проведения вторичной циторедуктивной хирургии или отказа от операции с последующей химиотерапией. Увеличение общей выживаемости составило шесть месяцев в группе вторичной хирургической операции (20 месяцев против 26 месяцев) [179]. Однако эти результаты не были подтверждены в испытании GOG-152 [180]. Дизайн этого исследования был аналогичен EORTC-55865, использованный режим химиотерапии представлял собой комбинацию паклитаксела и цисплатина, а общая выживаемость составила 10,5 против 10,7 месяцев. Основываясь на этих данных можно сделать вывод, что вторичная циторедуктивная операция не улучшает выживаемость у пациенток, которые подверглись циторедуктивным вмешательствам при первичном удалении опухоли в специализированных гинекологических онкологических центрах [155].

Основным очагом поражения при эпителиальном РЯ является висцеральная и париетальная брюшина. Поэтому региональная терапия посредством внутрибрюшинного введения рассматривалась в конце 1990-х годов в качестве перспективного метода лечения [19, 124]. GOG-172 клиническое исследование III фазы показало повышение общей выживаемости на 15,9 месяцев (65,6 месяцев

против 49,7 месяцев) при внутривенном введении паклитаксела и цисплатина по сравнению с внутривенным введением этих препаратов. Однако только 42% пациентов в группе, получавшей внутривенную терапию, завершили шесть циклов назначенной терапии из-за повышенной токсичности и осложнений, связанных с катетером. В соответствии с полученными результатами исследования использование внутривенной химиотерапии не получило всеобщего признания [22].

Концепция оптимизации химиотерапии также включала стратегию высокодозной химиотерапии. По данным исследования NOVEL, проведенном в Японии высокодозная химиотерапия показала более длительный период без прогрессирования (28,1 против 17,5 месяцев), а также лучшую медианную выживаемость (100,5 против 62,2 месяцев) [95].

Результаты ICON-8 продемонстрировали, что еженедельное введение паклитаксела в качестве части терапии первой линии лечения эпителиального РЯ не увеличивало выживаемость без прогрессирования [56].

Многоцентровое итальянское исследование с еженедельным введением карбоплатина и паклитаксела в течение 18 недель по сравнению с инфузией препаратов раз в три недели, показало аналогичные результаты выживаемости без прогрессирования (18,3 месяцев против 17,3) [142].

Самым важным независимым прогностическим фактором для общей выживаемости по-прежнему является отсутствие резидуальной опухоли после первичной циторедуктивной операции [184]. Тем не менее, у некоторых пациенток после операции сохраняется объемная резидуальная опухоль, даже если они лечились в специализированных онкологических центрах. Альтернативная стратегия связана с проведением неoadъювантной химиотерапии и последующей интервальной операции у пациенток с диссеминированным эпителиальным РЯ. В 2010 году были опубликованы результаты исследования EORTC 55971, в котором сообщалось об аналогичной медиане выживаемости (30 месяцев в группе неoadъювантная химиотерапия против 29 месяцев в группе

первичное хирургическое лечение) и медиане выживаемости без прогрессирования 12 месяцев в обеих группах [183]. Эти результаты были подтверждены в исследовании CHORUS, опубликованном 5 лет спустя (медиана общей выживаемости 24,1 месяца в группе неoadьювантной химиотерапии против 22,6 месяца в группе хирургического лечения) [97].

Стандартным лечением РЯ остается циторедуктивная операция с последующей химиотерапией на основе платины. Однако такие особенности заболевания, как значительная исходная распространенность (65-75% новых случаев относятся к III-IV стадиям заболевания) и высокая частота развития рецидивов после первичного лечения послужили основой для исследования таргетных препаратов в системной терапии РЯ.

Таргетная терапия

Наибольшие успехи в таргетной терапии РЯ в настоящее время связаны с применением антиангиогенных препаратов и ингибиторов фермента поли (АДФ-рибоза) полимеразы (PARP).

Необходимым этапом пролиферации и инвазии опухоли является неоангиогенез. Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) является наиболее важным проангиогенным фактором и важным промотором прогрессирования эпителиального РЯ [31]. Бевацизумаб – наиболее изученный антиангиогенный препарат, представляющий собой гуманизированное моноклональное антитело к сосудистому эндотелиальному фактору роста А (VEGF-A). Препарат избирательно связывается с VEGF-A в кровотоке и блокирует его взаимодействие с рецептором VEGFR на эндотелии сосудов.

В рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании 3 фазы GOG 218 [40] на 1872 пациентках с первичным РЯ сравнивали три вида лечения: стандартная химиотерапия (6 циклов химиотерапии: паклитаксел 175 мг/м² + карбоплатин АUC-6 каждые 3 недели); стандартная химиотерапия + бевацизумаб 15 мг/кг каждые 3 недели, стандартная химиотерапия с бевацизумабом, который затем продолжали до прогрессирования.

При этом медиана выживаемости без прогрессирования в группе с продолжением «поддерживающей» терапии бевацизумабом была достоверно выше, чем у тех больных, которым ингибиторы роста эндотелия сосудов отменяли вместе с химиотерапией или не вводили совсем (14,1 месяцев; 11,2 месяцев и 10,3 месяцев в 3-й, 2-й, 1-й группах соответственно, $p < 0,0001$). В другом исследовании III фазы ICON7 также оценивали роль добавления бевацизумаба к стандартной химиотерапии первичного РЯ. Однако это не влияло на показатели общей выживаемости, которые были одинаковыми [140, 39].

Эффективность бевацизумаба при платино-чувствительных рецидивах РЯ оценивали в рандомизированном плацебо-контролируемом исследовании 3 фазы OCEANS [17], в которое были включены 484 пациентки с прогрессированием заболевания через 6 месяцев и более после окончания первой линии химиотерапии на основе платины. Осуществляли рандомизацию на химиотерапию комбинацией гемцитабина с карбоплатином в сочетании с бевацизумабом 15 мг/кг 1 раз в 3 недели (основная группа) или с плацебо (контрольная группа). После 6-10 циклов комбинированную химиотерапию прекращали и продолжали один бевацизумаб или плацебо. Добавление бевацизумаба достоверно увеличило медиану выживаемости без прогрессирования до 12,4 месяцев против 8,4 месяцев в группе плацебо (отношение рисков (OR)=0,484; $p < 0,0001$). Анализ продолжительности жизни также не выявил существенных различий между сравниваемыми группами [17].

Кроме бевацизумаба, в клинических исследованиях при РЯ оценивали другие антиангиогенные препараты, включая ловушку факторов роста афлиберцепт, антитело тробананиб, а также мультикиназные ингибиторы пазопаниб, нинтеданиб, седираниб, сунитиниб и сорафениб, которые блокируют тирозинкиназы большого количества различных рецепторов, включая рецепторы VEGF, и прерывают активацию многочисленных дополнительных внутриклеточных сигнальных путей. Однако в настоящее время данные препараты не нашли широкого применения при лечении РЯ.

Другой фармакологической мишенью для проведения таргетной терапии РЯ является фермент PARP1. PARP представляют собой большое семейство многофункциональных ферментов, наиболее изученным из которых является PARP1. Он играет ключевую роль в восстановлении одноцепочечных разрывов ДНК, обеспечивая репарацию разрушенной ДНК путем эксцизии азотистых оснований. Ингибиторы PARP блокируют активность этого фермента и таким образом нарушают процесс восстановления ДНК, что приводит к накоплению двухцепочечных разрывов с последующей индукцией «синтетической летальности» [25, 38, 73, 78, 139]. Олапариб - первый ингибитор PARP, одобренный для клинического применения в качестве поддерживающей терапии при платино-чувствительных рецидивах РЯ после ответа на платиносодержащую терапию.

В исследовании на 265 пациентках с платино-чувствительными рецидивами серозного РЯ, которые получили 2 и более линии платино-содержащей химиотерапии с полным или частичным ответом на последний режим лечения, оценивали эффективность олапариба по сравнению с плацебо. По данным исследования олапариб достоверно увеличил выживаемость без прогрессирования по сравнению с плацебо: медианы составили 8,4 месяцев против 4,8 месяцев (ОР=0,35; 95% Доверительный интервал (ДИ): 0,25–0,49; $p<0,001$) [109].

В 2017 году были представлены положительные результаты применения олапариба в 3 фазе исследования SOLO2/ENGOT-Ov21, подтверждающие эффективность олапариба на группе 295 больных с платиночувствительными рецидивами РЯ с мутациями BRCA1/2, которые получили не менее двух линий предшествующей химиотерапии. Было показано, что поддерживающая терапия олапарибом достоверно (более чем в 3 раза) увеличила выживаемость без прогрессиования по сравнению с плацебо: медианы составили 19,1 мес. против 5,5 мес. соответственно (ОР=0,30; 95% ДИ: 0,22-0,41; $p<0,0001$) [145].

Таким образом, значительное число таргетных препаратов продолжают

изучать при РЯ на различных этапах развития болезни. Клинически одобренными стратегиями на сегодняшний день являются: назначение бевацизумаба в комбинации с химиотерапией при первичном раке яичников у больных высокого риска, при платино-чувствительных и платино-резистентных рецидивах заболевания, а также применение ингибитора PARP в качестве поддерживающего лечения при мутациях BRCA1/2.

1.2. МикроРНК в патогенезе рака яичников

1.2.1. Общие сведения о микроРНК

МикроРНК (microRNAs, miRNAs) представляют собой эндогенные небольшие (18-22 нуклеотида) некодирующие РНК, которые обеспечивают пост-транскрипционное молчание генов [36, 171]. МикроРНК впервые обнаружили в начале 1990 г. у *Caenorhabditis elegans*, последующие исследования подтвердили их присутствие почти у всех видов растений и животных [114].

МикроРНК негативно регулируют свои гены-мишени одним из двух способов, в зависимости от степени комплементарности с целевыми матричными (или мессенджер) РНК (мРНК), кодирующими белки. МикроРНК, которые связываются с полной или почти идеальной комплементарностью с последовательностями мРНК, индуцируют путь РНК-опосредованной интерференции (RNAi), в котором транскрипты мРНК расщепляются с помощью микроРНК-ассоциированного РНК-индуцированного комплекса подавления (miRISC). Этот механизм в основном наблюдается у растений, хотя микроРНК-направленное расщепление мРНК встречается и у животных. Считается, что большинство микроРНК животных действуют путем связывания с несовершенными комплементарными сайтами в пределах 3'-нетранслируемой области (UTR) мРНК-мишеней и ингибирования инициации трансляции через комплекс miRISC [71, 72].

МикроРНК могут также взаимодействовать с 5'-UTR, кодирующей последовательностью и промоторными областями своих мишеней. В некоторых случаях взаимодействие микроРНК с последовательностями мишеней может индуцировать трансляцию или регулировать транскрипцию. Несколько параметров, включая субклеточное положение микроРНК, количество микроРНК и целевых мРНК, а также средство взаимодействий, модулируют взаимодействие микроРНК-мРНК [35].

На рисунке 1 представлены пути биогенерации и уровни регуляции экспрессии микроРНК.

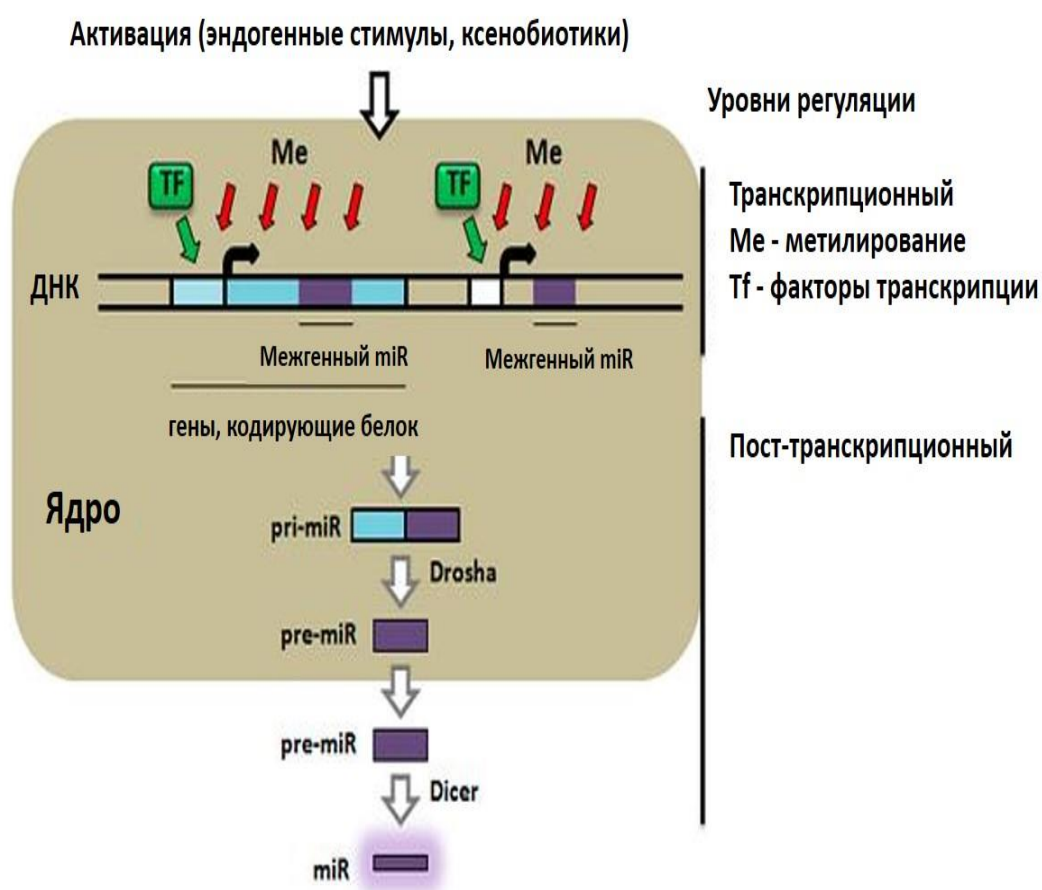


Рисунок 1 – Уровни регуляции экспрессии микроРНК [77]

Большинство генов микроРНК расположены в межгенных областях генома, хотя они также наблюдаются в экзонных и интронных областях в смысловой или антисмысловой ориентации. Подобно генам, кодирующим белки, гены микроРНК

в основном транскрибируются с помощью РНК-полимеразы II. Первоначально они транскрибируются как большие РНК-предшественники, называемые *pri-miRNA*, которые процессируются в ядре ферментом рибонуклеазой III Droscha в сотрудничестве с РНК связывающим белком Pasha (также известным как DGCR8). Процессинг *pri-miRNAs* производят молекулы длиной 70 пар нуклеотидов, называемые *pre-miRNAs*, которые складываются в несовершенные структуры стержень-петля. Пре-миРНК экспортируются в цитоплазму ядерным экспортным белком Exportin-5 (XPO5). Попад в цитоплазму, пре-микроРНК высвобождаются GTP-зависимым образом и обрабатываются другой рибонуклеазой III, Dicer, в комплексе с двухцепочечным РНК-связывающим белком TRBP с образованием функциональной микроРНК длиной 22 нуклеотида [77].

1.2.2. Экспрессия и функция микроРНК при раке яичников

Несколько исследований показали, что дисрегулируемая экспрессия микроРНК вносит вклад в иницирование и прогрессирование рака человека [63, 71, 72]. Так, подавление субпопуляции микроРНК является обычно наблюдаемым признаком рака, что указывает на то, что эти молекулы могут действовать как опухолевые супрессоры. Первое сообщение об изменении экспрессии микроРНК при раке было связано с частыми хромосомными делециями и подавлением экспрессии *miR-15* и *miR-16*, двух микроРНК, которые, как предполагается, нацелены на антиапоптотический фактор BCL2 при хроническом лимфолейкозе [43].

Впервые публикации о связи микроРНК с РЯ появились в 2007 г. Исследования как *in vitro*, так и *in vivo* показали aberrантную экспрессию микроРНК в клетках РЯ. Функциональные исследования выявили их участие в фундаментальных процессах, таких как контроль клеточного цикла, апоптоз, пролиферация и инвазия клеток. Затем количество публикаций возрастало и к

2013 г. был опубликован систематизированный обзор [54]. Было проанализировано более 70 исследований, в ряде из которых опубликованы результаты сравнения профилей микроРНК в нормальной или в ткани доброкачественных опухолей яичников, а также способы валидации полученных результатов [100, 131].

В соответствии с более высокой частотой эпителиального РЯ, в большинстве исследований оценивали экспрессию микроРНК при этом типе опухоли. Аберрантная экспрессия микроРНК в клетках РЯ не только дифференцирует эти клетки от нормальных тканей яичников, но также может коррелировать с гистотипом, лимфоваскулярной инвазией и инвазией органов, а также вовлечением поверхности яичников [84]. Сравнение уровней экспрессии микроРНК на разных стадиях РЯ показало сигнатуры, связанные со стадиями. Например, R. Eitan et al. (2009) обнаружили дифференциальную экспрессию 18 miRNAs, включая hsa-miR-449b, между I и III стадиями, которые ассоциировались с резистентностью к химиотерапии на основе препаратов платины и выживаемостью больных РЯ.

В нескольких исследованиях оценивали экспрессию микроРНК в опухолях зародышевых клеток яичников и стромальных опухолях яичников. R.K. Chang et al. идентифицировали 9 микроРНК в опухолях зародышевых клеток яичников (2 злокачественных и 7 исходных) и 3 в стромальных опухолях яичников с помощью секвенирования малых РНК [48]. Авторы обнаружили существенные различия в профиле микроРНК между этими тремя группами. Впоследствии они оценили экспрессию 12 выбранных микроРНК в большей группе пациентов и обнаружили сверхэкспрессию *miR-373-3p*, *miR-372-3p*, *miR-302c-3p* и подавление *miR-199a-5p*, *miR-214-5p* и *miR-202-3p* в злокачественных опухолях зародышевых клеток яичников по сравнению с двумя другими типами образцов РЯ. Более того, *miR-202c-3p* и *miR-513c-5p* обладают более высокой экспрессией при стромальных опухолях яичников по сравнению с доброкачественными опухолями

зародышевых клеток яичников [48]. Профиль основных микроРНК при РЯ и их функции представлены в таблице 1 [84].

Таблица 1 – Профиль микроРНК в клетках рака яичников [84]

| микроРНК | Влияние на экспрессию | Мишень | Функция | Ссылка |
|-----------------|-----------------------|--------|---|--------|
| <i>miR-718</i> | индукция | VEGF | Связь <i>miR-718</i> / VEGF может обеспечить потенциальную терапевтическую мишень для лечения рака яичников | [110] |
| <i>miR-200c</i> | индукция | ZEB1 | Сверхэкспрессия <i>miR-200c</i> снижает экспрессию ZEB1, которая напрямую ингибирует EMT в CD44 + CD117 + CSC | [50] |
| <i>miR-124</i> | ингибирование | SphK1 | <i>miR-124</i> подавляет миграцию и инвазию опухолевых клеток путем подавления SphK1 | [201] |
| <i>miR-340</i> | ингибирование | NF-κB1 | <i>miR-340</i> может ингибировать инвазию, пролиферацию и индуцируют апоптоз за счет воздействия на NF-κB1 в клетках рака яичника | [113] |
| <i>miR-335</i> | ингибирование | Bcl-w | <i>miR-335</i> - независимый предиктор плохой выживаемости у пациентов с эпителиальным раком яичника | [44] |
| <i>miR-215</i> | ингибирование | NOB1 | <i>miR-215</i> подавляет рост клеток путем ингибирования NOB1 | [115] |

| | | | | |
|--------------------|---------------|--------|---|-------|
| <i>miR-429</i> | ингибирование | ZEB1 | Сверхэкспрессия miR-429 увеличивает чувствительность к цисплатину, может снизить связанный с аутофагией белок анти-LC3A / B и анти-ATG7 | [203] |
| <i>miR-320</i> | ингибирование | TWIST1 | miR-320 как ген, подавляющий опухоль, может подавлять клеточный цикл, пролиферацию и инвазию с помощью таргетинга TWIST1 | [112] |
| <i>miR-143-3p</i> | ингибирование | TAK1 | miR-143-3p может снижать экспрессию (TGF) β -активированной киназы 1 (TAK1), а также ингибировать миграцию, пролиферацию и инвазию раковых клеток <i>in vitro</i> | [52] |
| <i>miR-551b-3p</i> | индукция | TWIST1 | miR-551b-3p стимулирует STAT3, который играет ключевую роль в физиологическом ответе, включая выживаемость клеток, дифференцировку и/или метастазы | [47] |
| <i>miR-490-3p</i> | ингибирование | CDK1 | Сверхэкспрессия MiR-490-3P может способствовать остановке G1 / S или G2 / M и апоптозу, уменьшать клеточную инвазию, миграцию, пролиферацию, инвазию и может снижать | [53] |

| | | | | |
|-------------------|---------------|-----------|---|-------|
| | | | экспрессию мРНК или белка SMARCD1, CCND1, CDK1, Bcl-xL, MMP2 / 9 и, наконец, может индуцировать экспрессию P53. | |
| <i>miR-206</i> | ингибирование | АКТ/mTOR | miR -206 может подавлять через C-Met / АКТ / сигнальный путь mTOR | [64] |
| <i>miR-152</i> | ингибирование | FOXP1 | miR-152, взаимодействуя с FOXP1, тормозит пролиферацию и миграцию раковых клеток | [150] |
| <i>miR-142-3p</i> | ингибирование | sirtuin 1 | miR-142-3p, направляя SIRT1, может ингибировать пролиферацию и химиорезистентность раковых клеток | [81] |
| <i>miR-138</i> | ингибирование | SOX12 | miR-138 ингибируя экспрессию SOX12, может подавлять пролиферацию, инвазию и миграцию опухолевых клеток | [151] |
| <i>miR-25</i> | индукция | LATS2 | miR-25 регулируя LATS2, может стимулировать рост и подвижность опухолевых клеток | [75] |
| <i>miR-613</i> | ингибирование | KRAS | miR-613, воздействуя на KRAS, снижает развитие и | [80] |

| | | | | |
|-----------------|---------------|-------|---|-------|
| | | | прогрессирование рака яичников | |
| <i>miR-148a</i> | ингибирование | S1PR1 | miR-148a может ингибировать миграцию, пролиферацию и инвазию раковых клеток | [192] |
| <i>miR-144</i> | ингибирование | RUNX1 | miR-144, нацеливаясь на RUNX1, подавляет рост и прогрессирование раковых клеток | [90] |

1.2.3. Роль метилирования в регуляции микроРНК

МикроРНК играют критическую роль в регуляции клеточного цикла, дифференцировке клеток, пролиферации, миграции, адгезии, апоптозе, ангиогенезе, функционировании стволовых клеток, реакции на стресс и других фундаментальных биологических процессах, связанных с развитием и прогрессированием злокачественных новообразований. Они могут ингибировать экспрессию опухоль-ассоциированных генов и функционировать как онкосупрессоры, так и онкогены.

Получены многочисленные и убедительные данные о роли микроРНК и их генов-мишеней в патогенезе и метастазировании РЯ [117, 118, 133, 148, 178].

МикроРНК и их специфические гены-мишени вовлечены в регуляцию сигнальных путей, участвующих в патогенезе и метастазировании РЯ [30, 178].

Хотя механизмы, лежащие в основе дисрегуляции самих микроРНК при раке еще полностью не изучены, недавние исследования показали, что важную роль в регуляции их экспрессии играют эпигенетические механизмы. Эпигенетическое подавление генов из-за гиперметилирования нуклеотидных пар

цитозин-гуанин (СрG-островки) промотора является одним из наиболее распространенных механизмов, с помощью которых гены-супрессоры опухолей инактивируются во время туморогенеза. В настоящее время показано, что примерно половина классических генов-супрессоров опухолей, которые, как известно, мутированы при синдромах семейного рака, инактивируются также гиперметилированием промоторов [74]. Помимо классических опухолевых супрессоров, все большее количество генов, связанных с контролем клеточного цикла, репарацией ДНК, инвазивностью опухолей и реакцией на факторы роста, идентифицируется как инактивированные гиперметилированием в тканях при злокачественных новообразованиях [170]. Более того, недавние достижения в области технологий микромассивов и секвенирования позволили провести всесторонний анализ экспрессии эпигенома и микроРНК в раковых клетках, в результате список генов микроРНК, подавленных метилированием при раке, существенно увеличился [119].

Показано, что гены микроРНК могут быть подавлены гиперметилированием промоторных СрG-острочков, подобно генам, кодирующим белки, и что процент генов, дерегулируемых aberrантным метилированием, значительно выше среди генов микроРНК, чем генов, кодирующих белки [143].

Статус метилирования генов *miR-34b* и *miR-34c* также типичен для хронического лимфолейкоза, что позволяет классифицировать эти микроРНК как опухолевые супрессоры [65]. Установлено, что метилирование промотора гена *miR-210* может подавлять экспрессию этой микроРНК, что является важным этапом в процессе ангиогенеза [199]. Метилирование промоторов *miR-124-2*, *miR-218-1*, *miR-218-2* и *miR-34b/c* было заметно выше в клетках карциномы шейки матки с инфекцией HPV16 [94]. Похожим образом метилирование промотора *miR-33b* повышается при раке желудка [195].

Измененное метилирование генов, кодирующих микроРНК, связанное с нарушением регуляции экспрессии зрелой микроРНК, может быть связано с факторами питания и образа жизни и способствует развитию рака. В

исследовании случай–контроль F.Cordero et al. [59] проанализировали уровни метилирования ДНК генов, кодирующих микроРНК, в периферических лейкоцитах пациентов с колоректальным раком или раком молочной железы. Исследователи обнаружили несколько дифференциально метилированных генов микроРНК, связанных с возрастом, полом, курением. Они пришли к выводу, что метилирование микроРНК, обнаруживаемое в крови, может представлять собой биомаркер для раннего обнаружения или риска развития рака. ДНК-метилирование промоторов микроРНК, таких как кластер Hsa-mir-200b, может рассматриваться как биомаркер подтипа рака молочной железы с прогностическим значением [191]. Показано, что гиперметилирование промотора является одним из основных механизмов подавления miR-31 в клеточных линиях клеток triple-negative breast cancer (тройной негативный рак молочной железы) [27]. Метилирование ДНК и регуляция микроРНК играют важную роль в наследственном раке молочной железы [144].

1.2.4. Возможности микроРНК как диагностических маркеров рака яичников

D.D. Taylor et al. (2008) выделили циркулирующие опухолевые экзосомы от больных РЯ и сравнили их профили микроРНК с образцами опухолей от тех же пациенток. Они сообщили об аналогичных уровнях 8 микроРНК в клеточных и экзосомальных источниках. Более того, профили экзосомальной микроРНК больных РЯ отличались от пациенток с доброкачественными заболеваниями. Экзосомальную микроРНК не удалось обнаружить у здоровых людей. Основываясь на этих результатах, было предложено профилировать микроРНК циркулирующих экзосом опухолей в качестве альтернативы диагностической биопсии, которые могут быть использованы в качестве скрининга у бессимптомных пациенток [173].

A. Yokoi et al. (2018) [196] оценили профили циркулирующих микроРНК

большой когорты больных РЯ и предложили оптимальную диагностическую модель, основанную на профиле экспрессии десяти микроРНК. Точность предложенной ими модели была подтверждена на пациентках. Эта модель имела 99% чувствительность и 100% специфичность даже на ранней стадии РЯ. Кроме того, были созданы две дополнительные модели, основанные на уровнях экспрессии 9-10 циркулирующих микроРНК, которые могут дифференцировать РЯ от других видов солидных опухолей или доброкачественных опухолей яичников [196].

К.Е. Resnick et al. (2009) сравнили экспрессию микроРНК в образцах сыворотки 28 больных РЯ и 15 здоровых людей. Они сообщили о дифференциальной экспрессии 21 микроРНК между двумя группами. *miRNA-21*, *miRNA-92*, *miRNA-93*, *miRNA-126* и *miRNA-29a* имели более высокую экспрессию у онкологических пациенток по сравнению с контролем, тогда как *miRNAs-155*, *miRNA-127* и *miRNA-99b* имели противоположную тенденцию [153].

V. Elgaaen и др. [185] сначала провели сравнительный анализ спектра экспрессии микроРНК в ткани HGSC, светлоклеточного рака и поверхностного эпителия яичников методом микрочипов (Affymetrix GeneChipmiRNA 2.0 Arrays), а затем — валидацию полученных данных на примере 18 из 78 дифференциально экспрессированных микроРНК методом ПЦР-РВ. Наибольшее увеличение экспрессии в HGSC по сравнению с нормальным эпителием отмечено для *miR-205-p*, также в HGSC и в светлоклеточном раке наблюдалась гиперэкспрессия микроРНК семейства *miR-20* и *miR-182-p*. В то же время экспрессия *miR-383* была значительно снижена. Высокая экспрессия *miR-200c-3p* была ассоциирована с ухудшением выживаемости без прогрессирования и общей выживаемости больных HGSC. Кроме того, авторы выявили 4 микроРНК (*miR-509-3-5p*, *miR-509-5p*, *miR-509-3p* и *miR-510*), позволяющие дифференцировать светлоклеточный рак и HGSC.

1.2.5. Прогностическая роль микроРНК при раке яичников

R. Eitan et al. (2009) сообщили о связи между плохим прогнозом больных РЯ и более высокими уровнями экспрессии hsa-miR-23a, hsa-miR-27a, hsa-miR-24-2 и hsa-miR-21.

С другой стороны, высокая экспрессия hsa-miR-449b была связана с лучшим прогнозом у больных РЯ. Среди этих miRNAs hsa-miR-23a и hsa-miR-27a считали предикторами как выживаемости, так и выживаемости без рецидива. Примечательно, что экспрессия hsa-miR-27a была характерна для пациенток с неблагоприятным прогнозом, которые имели прогрессирование заболевания на фоне химиотерапии первой линии [70].

Prahn et al. (2018) оценили экспрессию микроРНК в опухоли 197 пациенток с эпителиальным РЯ с помощью метода микрочипов. Они идентифицировали корреляцию между общей выживаемостью и уровнями экспрессии *miR-1183* и *miR-126-3p*, временем до прогрессирования и уровнями экспрессии *miR-139-3p* и *miR-802*, выживаемостью без прогрессирования и уровнями экспрессии *miR-23a-5p*, *miR-23a-3p* и *miR-802*, устойчивостью к химиотерапии и уровнем экспрессии *miR-1234* [146].

Крупное многоцентровое исследование показало связь между снижением уровней *miR-200b*, *miR-1274a* и *miR-141* и лучшей выживаемостью больных РЯ. Корреляция между экспрессией *miR-1274a* и исходом для пациенток была выражена при серьезных опухолях высокой степени злокачественности. Снижение регуляции *miR-200c* было связано с 5-месячным увеличением выживаемости без прогрессирования, когда пациенток лечили бевацизумабом по сравнению с обычной химиотерапией [89].

Недавний мета-анализ выявил связь между экспрессией семейств *miR-200* и *miR-30* и выживаемостью больных РЯ. Анализ подгрупп показал связь между более высоким уровнем экспрессии *miR-200c* и лучшей общей выживаемостью. Более того, повышенная экспрессия *miR-200a*, *miR-200c* и *miR-141* была связана с

лучшей выживаемостью без прогрессирования. Наконец, сверхэкспрессия *miR-30d-5p* была связана с лучшей общей выживаемостью [159].

Особый интерес представляет роль различных микроРНК в формировании лекарственной резистентности РЯ. По данным К. Vanno et al. [28], анализируя работы, опубликованные до 2014 г., с чувствительностью РЯ к химиотерапии в той или иной степени связаны 27 различных микроРНК.

Учитывая сложную регуляцию экспрессии микроРНК, трудно оценить относительный вклад метилирования промоторов генов микроРНК. Таким образом, необходимы дальнейшие исследования роли метилирования в регуляции экспрессии микроРНК вместе с другими механизмами.

1.3. Контрольная точка иммунитета PD-1/PD-L1

1.3.1. Общие сведения о PD-1 и PD-L1

В последнее десятилетие большой интерес исследователей вызывают контрольные точки иммунитета и, в частности, основные компоненты этой системы – рецептор программируемой гибели клеток PD-1 и его лиганд PD-L1 [104].

Ген, кодирующий PD-1, относится к суперсемейству генов иммуноглобулинов и впервые выделен Y. Ishida et al. в 1992 году. Подобно другим ингибирующим корецепторам, PD-1 был обнаружен в Т-клетках, В-клетках, активированных моноцитах, дендритных клетках, естественных киллерах (NK) [45, 99].

PD-1 состоит из внеклеточного иммуноглобулиноподобного связывающего домена (IgV domain), трансмембранной области и цитоплазматического домена, который имеет потенциальные сайты фосфорилирования и содержит иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM) и иммунорецепторный тирозиновый мотив переключения (- ITSM) [99, 158].

На данном этапе исследований описаны два лиганда PD-1: лиганд программируемой смерти 1 (PD-L1, CD274 или B7-H1) и лиганд программируемой смерти 2 (PD-L2, CD273, B7-DC). Данные белки имеют 37% гомологию аминокислотных последовательностей [67, 107].

PD-L1 принадлежит к типу I трансмембранных белков и состоит из внеклеточных доменов (IgV-подобный домен, IgC-подобный домен, сигнальная последовательность), трансмембранного домена и внутриклеточных доменов. PD-L1 конститутивно экспрессируется на антигенпрезентирующих клетках, нелимфоидных органах и негематопоэтических клетках, таких как сердце, легкие, плацента и печень [99]. Широко экспрессируемый PD-L1 участвует в самотолерантности, например, в защите периферических тканей от чрезмерного воспаления и аутоиммунных патологий [46].

PD-L2 преимущественно экспрессируется на дендритных клетках и некоторых макрофагах [92].

PD-L1 индуцируется различными провоспалительными цитокинами, такими как IFN- γ (интерферон- γ), TNF- α (фактор некроза опухоли- α), VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор) и ИЛ-10. Активированные Т-хелперные клетки ответственны за образование IFN- γ и TNF- α , а опухолевые стромальные клетки продуцируют VEGF и GM-CSF.

Повышенная экспрессия PD-L1 в опухолевых клетках способствует подавлению иммунитета в микроокружении опухоли [46], что получило название «адаптивной иммунной резистентности» [172].

В холангиоцитах человека экспрессия PD-L1 индуцировалась IFN- γ и микроРНК-513, которая комплементарна 31-нетранслируемой области мРНК PD-L1 [87]. РИЗК может увеличивать трансляцию мРНК PD-L1 и вызывать повышение экспрессии белка PD-L1 [62]. Экспрессия PD-L1, индуцируемая IFN- γ , также зависела от NF- κ B. За исключением связывания PD-1, PD-L1 также связывается с CD80 для формирования тормозного сигнала, индуцирующего

Роль PD-1/PD-L1 в аутоиммунитете была продемонстрирована на мышях с нокаутом PD-1, у которых нарушение периферической иммунной толерантности приводило к активации лимфоцитов, приводящей к аутоиммунным процессам, тип которых зависел от генетического фона мышей [98, 134].

1.3.2. Экспрессия PD-1 и PD-L1 при онкологических заболеваниях

Концепция «иммунного надзора» была введена 50 лет назад Томасом и Бернетом [41, 175]. Их теория совпадала с исследованиями P.C. Doherty et al. (1975) и R.M. Zinkernagel [66], где они продемонстрировали, что иммунная система играет важную роль в иммунном надзоре, распознавая небольшие пептидные эпитопы в сочетании с главным комплексом гистосовместимости I (MHC-I), представленным на поверхности инфицированных вирусами клеток.

Также было показано, что опухолевые клетки экспрессируют MHC-I и представляют короткие ассоциированные с опухолью пептиды иммунным клеткам [61].

Однако опухолевые клетки могут уклоняться от иммунного надзора хозяина с помощью ряда защитных механизмов, включая подавление молекул MHC-I, секрецию противовоспалительных цитокинов (TGF- β и IL-10), секрецию иммуносупрессивных факторов, повышающую регуляцию PD-L1 и понижающую регуляцию ко-стимулирующих молекул, тем самым предотвращая активацию T-клеток, что приводит к инвазии рака [104].

Иммунитет против раковых клеток и их уничтожение зависят от индукции CD8 T-клеток и их дифференцировки в цитолитические клетки, что зависит от двух сигналов от антигенпредставляющих клеток. Один сигнал вырабатывается взаимодействием антигенного пептида (из опухоли), представленного на MHC, с T-клетками [45]. Другими являются ко-стимулирующие сигналы, B7 (B7-1 [CD80] и B7-2 [CD86]) на антигенпредставляющих клетках, которые связываются с CD28 (CD152 или CTLA-4) на T-клетках [111].

Однако раковые клетки могут избежать иммунного ответа хозяина, который во многих случаях напрямую задействует эти два сигнала. Такие механизмы уклонения включают снижение (или отсутствие) экспрессии ко-стимулирующих молекул (CD80, CD86), молекул адгезии или лиганда Fas на раковых клетках, подавление экспрессии МНС класса I и дефекты процессинга антигена [82].

Кроме того, у раковых клеток есть дополнительные механизмы ускользания, один из которых заключается в экспрессии PD-L1 и / или PD-L2 на их поверхности, что при связывании с PD-1, экспрессируемым активированными CD8⁺ Т-клетками, приводит к их анергии и/ или апоптозу. [122].

Известно, что опухолевые клетки могут стимулировать экспрессию PD-L1 через несколько онкогенных сигнальных путей, таких как NF- κ B, MAPK, mTOR, MEK/ERK/STAT1, PI3K и JAK/STAT, опосредованных IFN- γ [106, 116]. Блокада пути MyD88/TRAF6 или MEK/ERK ингибирует экспрессию PD-L1, индуцированную лигандами Toll-подобного рецептора и IFN- γ в плазматических клетках пациентов с миеломой [116].

H. Aranza et al. (2017) опубликовали обзор путей передачи сигнала PD-1 в Т-клетках. Интересно, что PD-L1 служит антиапоптотическим фактором для раковых клеток, формируя устойчивость к лизису CD8⁺ Т-клетками.

Наблюдается рост количества исследований, демонстрирующих, что опухолевые клетки (плоскоклеточный рак головы и шеи, РМЖ, рак легких, эндометрия, меланома) экспрессируют PD-L1, который подавляет иммунное микроокружение. При многих злокачественных новообразованиях, включая меланому, экспрессия PD-L1 связана с присутствием TIL (tumor-infiltrating lymphocytes) и экспрессией IFN- γ . Наблюдается значительное повышение PD-L1 у пациенток с запущенным немелкоклеточным раком легкого по сравнению со здоровыми людьми [202]. Отмечается повышение концентрации sPD-1 в плазме у больных раком яичников [14]. При РМЖ повышена экспрессия PD-L1 на первичных раковых клетках, что ассоциируется с эстроген- и прогестерон-отрицательным статусом экспрессии и гистологическим типом дифференцировки

III, а также с высокопролиферативными опухолевыми клетками, экспрессирующими Ki-67 [85], большими опухолями и коррелирует с плохим прогнозом [129]. Тройной негативный РМЖ имеет повышенную экспрессию PD-L1, что позволяет предположить, что для таких типов рака может быть полезна иммунотерапия [193]. Кроме того, повышена экспрессия PD-L1 в циркулирующих в крови метастатических клетках, что может быть использовано в качестве маркера у пациентов, перенесших блокаду иммунных контрольных точек [126]. Эти исследования демонстрируют, что экспрессия PD-L1 является независимым негативным прогностическим фактором рака.

Напротив, другие исследования показывают, что экспрессия PD-L1 связана с хорошим исходом заболевания. Экспрессия PD-L1 в тканях первичного РМЖ и легких связана с увеличением TIL, что связано с более длительной выживаемостью без рецидивов [29, 157]. Точно так же пациенты с НМРЛ с гиперэкспрессией PD-L1 имеют более длительную общую выживаемость, которая не зависит от возраста, стадии и гистологии. Более того, при меланоме меланоцитарные поражения совместно локализуются с PD-L1 и TIL, что улучшает прогноз [172]. Фактически, PD-L1-положительная метастатическая меланома имеет замедленное прогрессирование по сравнению с пациентами с PD-L1-отрицательной метастатической меланомой [172]. Эти данные предполагают, что экспрессия PD-1/PD-L1 имеет лучшее прогностическое значение при совместной экспрессии с TIL.

Роль PD-L2 при раке в настоящее время до конца не исследована.

1.3.3. Ингибирование PD-1 и PD-L2 в лечении онкологических заболеваний

Ингибиторы иммунных контрольных точек, которые блокируют рецептор PD-1 и его лиганда PD-L1, в настоящее время являются инновационными методами лечения при некоторых видах рака, включая меланому, рак легких и рак

желудка.

В настоящее время проводятся многочисленные клинические исследования для определения эффективности ингибиторов PD-1 и его лиганда (Таблицы 2 и 3). Ингибиторы PD-1 (включая ниволумаб и пембролизумаб) были одобрены FDA США для лечения прогрессирующей меланомы [26, 120, 190].

Пембролизумаб был одобрен для лечения пациентов с распространенным немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ), опухоли, которая экспрессирует PD-L1 [168].

Промежуточный отчет о лечении больных с НМРЛ или меланомой с метастазами в головной мозг показал, что ответ на метастазы в головной мозг был достигнут у 4/18 пациентов с меланомой и у 6/18 пациентов с НМРЛ [86].

Таблица 2 – Клиническая эффективность анти-PD-1-моноклональных антител

| Вещество | Заболевание | Результат | Ссылка |
|--|--|--|--------|
| Пембролизумаб | Ходжскиная лимфома IV стадии | После 6 месяцев лечения у пациента развился кожный саркоидоз, острый ирит, одышка и аденопатия | [60] |
| Пембролизумаб + anti-CD40 – (ипилимумаб) | Меланома | Стабильное течение болезни у 3/9 пациентов Средняя общая выживаемость 8 месяцев. Отсутствие нежелательных явлений 3/4 степени | [102] |
| Пембролизумаб | SCC тимуса с множественными метастазами в легкие | Метастазы в легких исчезли Полная ремиссия. Нет токсичности, кроме сыпи I степени | [194] |
| Пембролизумаб | Метастатическая | Побочные эффекты, нечеткость зрения, | [16] |

| | | | |
|-----------|--|--|-------|
| | увеальная меланома | увеит. Лечение прекращено | |
| Ниволумаб | Ходжскиная лимфома | 53/80 объективный ответ (утомляемость, сыпь, нейтропения, гипертермия у некоторых (4-20%) пациентов) | [197] |
| Ниволумаб | Лейомиосаркома с метастазами в легкие, кости, кожу | Метастазы регрессировали, кожные поражения почти полностью исчезли. Регресс в течение 6 месяцев. Никаких побочных эффектов | [91] |
| Ниволумаб | Метастазы | Острое отторжение трансплантата почки Меланома (реципиент трансплантата почки 14 лет назад) | [165] |

Хотя выраженные побочные эффекты при назначении данных препаратов редки, был зарегистрирован ряд негативных явлений, которые можно контролировать с помощью стандартных противовоспалительных средств. Сообщали, что пембролизумаб может вызывать колит, пневмонит, повышенную утомляемость, гиперкалиемию, острое повреждение почек, транзиторную когнитивную дисфункцию и судороги [86]. В редких случаях у пациенток, проходящих курс лечения пембролизумабом, развивался аутоиммунный диабет, возможно, в результате ингибирования PD-1 [125].

Кроме того, ниволумаб, первый одобренный ингибитор для лечения урологического рака, проявлял иммуноопосредованные побочные эффекты, включая нефрит, колит, диарею, пневмонит и гипертиреоз [136].

Таблица 3 – Клиническая эффективность анти-PD1-L1-моноклональных антител

| Вещество | Заболевание | Результат | Ссылка |
|--------------|--|---|--------|
| Авелумаб | Метастатическая карцинома из клеток Меркеля, резистентная к химиотерапии | Испытание фазы II, хорошо переносится, 28/88 пациентов достигли объективного ответа, полный ответ 8/88, частичный ответ 20/88, побочные эффекты 4 степени отсутствуют | [96] |
| Авелумаб | Рефрактерная метастатическая уротелиальная карцинома | Исследование фазы IB, объективный ответ у 18,2% пациентов, 5/44 полных ответа, усталость / астения, реакция, связанная с инфузией, тошнота, 3/44 степени, 3-4 нежелательных явления | [20] |
| Атезолизумаб | Местнораспространенная или метастатическая уротелиальная карцинома, принимаемая платиной | Одноэтапное исследование с участием пациентов, которые продолжали лечение после первоначальной инъекции, показало длительный клинический эффект | [132] |
| Атезолизумаб | Ранее леченный НМРЛ NSCLC | Испытание фазы III, 13,8 месяцев против 9,6 месяцев, улучшило выживаемость в группе лечения В целом хорошо переносится | [154] |

Однако побочные эффекты с использованием контрольных точек иммунитета менее часты по сравнению с химиотерапией и лучевой терапией. В 2016 году первый ингибитор PD-L1 (атезолизумаб; Tecentriq TM) был одобрен для использования в качестве терапии второй линии для лечения уротелиального рака. В 2017 году Атезолизумаб одобрен для лечения НМРЛ. Таким образом, углубленное знание механизмов и сигнальных путей, участвующих в индукции PD-1/PD-L1, может помочь в выборе лучших терапевтических вариантов [132, 154].

Тем не менее эта терапия эффективна не для всех пациентов, и необходимо изучить механизмы, лежащие в основе блокады анти-PD-1. В последние годы сообщается о важных открытиях, в частности об идентификации мутаций в генах JAK1, JAK2, β 2-микроглобулина, связанных с первичной и приобретенной резистентностью к терапии блокадой PD-1 [160, 200]. Однако, эти выводы однозначны и требуют дальнейших исследований.

Таким образом, имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о перспективности исследований микроРНК при злокачественных опухолях различных локализаций не только в целях повышения точности диагностики и прогноза, но и для выбора адекватного лечения, что особенно важно при высокорезистентных формах рака. Изучение основных компонентов сигнального пути контрольной точки иммунитета (PD-1/PD-L1) также имеет важное значение с точки зрения их возможной связи с микроРНК. В этом аспекте представляется актуальным изучением роли метилирования в регуляции экспрессии микроРНК в сопоставлении с анализом PD-1/PD-L1 на большом клиническом материале с одновременным исследованием крови и тканей больных РЯ.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика основных групп обследованных женщин с опухолями яичников и женщин группы контроля

В исследование включены 93 женщины, больных РЯ, 10 женщин с пограничными опухолями яичников и 22 больные с доброкачественными опухолями яичников проходивших обследование и лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. В качестве группы контроля взято 35 практически здоровых женщин. Диагноз всем больным выставлен на основании гистологического заключения. В таблице 4 представлены возрастные характеристики обследованных женщин основных групп. Средний возраст больных ДОЯ, как и больных ПОЯ был меньше, чем средний возраст больных ЗОЯ.

Таблица 4 – Возрастные характеристики обследованных женщин основных групп

| Группы | N | Возраст, лет | | p | Менопауза |
|--------------------------|----|--------------|---------|--|------------|
| | | M±m | Пределы | | |
| ⁰ Контроль | 35 | 42,9±2,3 | 18-68 | 0vs3<0,0001; 1vs3=0,06; 2vs3=0,018 | 11 (31,4%) |
| ¹ Больные ДОЯ | 22 | 49,7±3,5 | 18-74 | | 12 (54,6%) |
| ² Больные ПОЯ | 10 | 45,4±4,8 | 26-72 | | 4 (40%) |
| ³ Больные ЗОЯ | 93 | 55,4±1,1 | 32-78 | | 68 (73,1%) |

Распределение пациенток ЗОЯ по возрасту: 9 (9,7%) больных ЗОЯ были моложе 40 лет, 23 (24,7%) – в возрасте 41-50 лет, 34 (36,6%) – в возрасте 51-60 лет, 19 (20,4%) – в возрасте 61-70 лет и 8 (8,6%) – в возрасте от 71 и более лет.

В таблице 5 представлены данные анамнеза обследованных женщин с опухолями яичников. Больные ДОЯ, ПОЯ и ЗОЯ не различались по возрасту менархе, частоте наличия родов, абортов, выкидышей в анамнезе.

Таблица 5 – Характеристики анамнеза больных опухолями яичников основных групп

| Группы | N | ME<12 лет | Роды были | Аборты были | Выкидыши были |
|--------------------------|----|------------|------------|-------------|---------------|
| ¹ Больные ДОЯ | 22 | 10 (45,5%) | 18 (81,8%) | 13 (59,1%) | 2 (9,1%) |
| ² Больные ПОЯ | 10 | 3 (30%) | 9 (90%) | 4 (40%) | 0 |
| ³ Больные ЗОЯ | 93 | 43 (46,2%) | 84 (90,3%) | 49 (52,7%) | 12 (12,9%) |
| p | | >0,05 | >0,05 | >0,05 | >0,05 |

В то же время, в группе больных ДОЯ значимо реже выявляли другие гинекологические заболевания (36,4%), тогда как у всех 10 больных ПОЯ и у 86% больных ЗОЯ в анамнезе выявлены другие гинекологические заболевания (Таблица 6).

Таблица 6 – Распределение больных опухолями яичников основных групп по выявлению других гинекологических и сопутствующих заболеваний в анамнезе

| Группы | N | Гинекологические заболевания | Гинекологические операции | Сопутствующие заболевания |
|--------------------------|----|------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| ¹ Больные ДОЯ | 22 | 8 (37,4%) | 4 (18,2%) | 14 (63,6%) |

Продолжение таблицы 6

| | | | | |
|-----------------------------|----|------------|------------|------------|
| ² Больные ПОЯ | 10 | 10 (100%) | 4 (40%) | 4 (40%) |
| ³ Больные ЗОЯ | 93 | 80 (86,0%) | 15 (16,1%) | 71 (76,3%) |
| p | | 0,049 | >0,05 | >0,05 |

Наиболее часто во всех группах выявляли миому матки (у 4 в группе больных ДОЯ, у 7 в группе больных ПОЯ и у 39 в группе больных ЗОЯ). Группы не различались по частоте выполнения гинекологических операций в анамнезе. Группы не различались по частоте выявления сопутствующих заболеваний, из которых наиболее часто встречались сердечно-сосудистые заболевания и их сочетания с другими заболеваниями (у 14 в группе ДОЯ, у 3 в группе ПОЯ и у 58 больных ЗОЯ).

2.2. Характеристика больных злокачественными опухолями яичников

В таблице 7 представлено распределение больных РЯ по стадии заболевания. Преобладали больные IIIС стадии (45,1%). У 8 больных ЗОЯ выявлены метастазы в лимфатических узлах, у 5 – в отдаленных органах и тканях. Всего у 11 (11,8%) больных ЗОЯ выявлены метастазы. При этом у 6 – только в лимфатических узлах (из них у 3 больных Т3СN1M0, одна больная Т3AN1M0, одна пациентка Т2СN1M0 и у 1-й больной Т2AN1M0), у 3 только в отдаленных органах и тканях (Т3СN0M1) и у 2 одновременно в лимфоузлах и отдаленных органах и тканях (Т3СN1M1).

В таблице 8 представлены данные распределения больных РЯ по степени дифференцировки опухоли. Преобладали пациентки с неблагоприятной G3 степенью дифференцировки опухоли (58,1%).

Таблица 7 – Распределение больных раком яичников с учетом стадии заболевания

| FIGO | | Критерий Т | | Критерий N | | Критерий М | |
|-------------------|------------|-------------------|------------|-------------------|------------|-------------------|------------|
| Частота абс., (%) | | Частота абс., (%) | | Частота абс., (%) | | Частота абс., (%) | |
| Ia | 3 (3,2%) | 1A | 3 (3,2%) | 0 | 85 (91,4%) | M0 | 88 (94,6%) |
| Ib | 1 (1,1%) | 1B | 1 (1,1%) | 1 | 8 (8,6%) | M1 | 5 (5,4%) |
| Ic | 19 (20,4%) | 1C | 19 (20,4%) | | | | |
| IIa | 0 (0%) | 2A | 1 (1,1%) | | | | |
| IIb | 4 (4,3%) | 2B | 4 (4,3%) | | | | |
| IIc | 6 (6,5%) | 2C | 7 (7,5%) | | | | |
| IIIa | 6 (6,5%) | 3A | 7 (7,5%) | | | | |
| IIIb | 7 (7,5%) | 3B | 7 (7,5%) | | | | |
| IIIc | 42 (45,1%) | 3C | 44 (47,4%) | | | | |
| IV | 5 (5,4%) | | | | | | |

Таблица 8 – Распределение больных раком яичников по степени дифференцировки опухоли

| Степень дифференцировки опухоли | Частота Абс., (Отн.) |
|---------------------------------|----------------------|
| G1 | 15 (16,1%) |
| G2 | 24 (25,8%) |
| G3 | 54 (58,1%) |

На рисунке 3 представлено распределение больных ЗОЯ по гистологическому варианту строения опухоли.

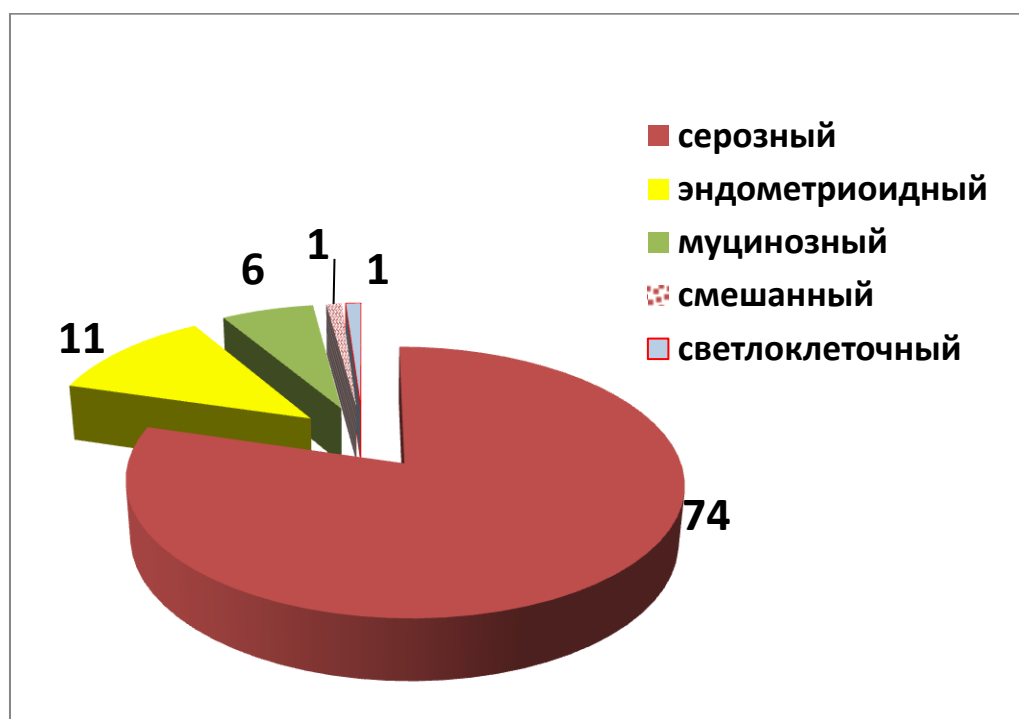


Рисунок 3 – Распределение больных РЯ по гистологическому варианту строения опухоли

По наличию асцитической жидкости в брюшной полости: у половины (50/53,8%) больных выявлен асцит, у 43/46,2% пациенток асцит не определяется.

В таблице 9 представлено распределение 93 больных ЗОЯ по наличию метастазов в большом сальнике.

Таблица 9 – Распределение больных злокачественными опухолями яичников по наличию метастазов в большом сальнике

| Метастазы в большом сальнике | Частота Абс., (Отн.) |
|------------------------------|----------------------|
| Не выявлены | 35 (37,6%) |
| До 2 см | 14 (15,1%) |
| До 5 см | 41 (44,1%) |
| «Панцирный» сальник | 3 (3,2%) |

В таблице 10 представлено распределение 93 больных РЯ по наличию диссеминации опухоли по брюшине.

Таблица 10 – Распределение больных раком яичников по наличию диссеминации опухоли по брюшине

| Диссеминация опухоли по брюшине | Частота Абс., (Отн.) |
|---------------------------------|----------------------|
| Не выявлена | 32 (34,4%) |
| До 1 см | 39 (41,9%) |
| От 1 см и более | 22 (23,7%) |

Опухолевые клетки в смывах из брюшной полости определяли только у 35 больных РЯ (Таблица 11).

Таблица 11 – Распределение больных раком яичников по выявлению опухолевых клеток в смывах из брюшной полости

| Опухолевые клетки в смывах из брюшной полости | Частота Абс., (Отн.) |
|---|----------------------|
| Не выявлены | 11 (31,4%) |
| Выявлены | 24 (68,6%) |

2.3. Лечение больных злокачественными опухолями яичников

В таблице 12 представлено распределение 93 больных РЯ по объему хирургического вмешательства.

Таблица 12 – Распределение больных РЯ с учетом объема хирургического вмешательства

| Объем хирургического вмешательства | Частота Абс., (Отн.) |
|---|----------------------|
| Экстирпация матки с придатками, оментэктомия, +/-лимфаденэктомия, субтотальная перитонэктомия | 82 (88,1%) |
| Ампутация матки с придатками, оментэктомия | 5 (5,4%) |
| Аднексэктомия, резекция большого сальника | 6 (6,5%) |

В таблице 13 представлено распределение больных РЯ по объему хирургического вмешательства.

Таблица 13 – Распределение больных раком яичников по виду хирургического вмешательства

| Вид хирургического вмешательства | Частота Абс., (Отн.) |
|----------------------------------|----------------------|
| Полная | 46 (49,5%) |
| Оптимальная | 21 (22,6%) |
| Не оптимальная | 26 (27,9%) |

Химиотерапевтическое лечение проведено 90 из 93 пациенток ЗОЯ (Таблица 14).

Таблица 14 – Распределение больных раком яичников с учетом проводимой химиотерапии

| Химиотерапия | Частота Абс., (Отн.) |
|------------------------------------|----------------------|
| Карбоплатин+Паклитаксел | 56 (60,2%) |
| Карбоплатин+Паклитаксел+Авастин | 14 (15,0%) |
| Цисплатин+Доксорубицин+Циклофосфан | 9 (9,7%) |
| Карбоплатин | 6 (6,5%) |
| Цисплатин+Циклофосфан | 5 (5,4%) |
| Не проводили | 3 (3,2%) |

Химиотерапию по схеме карбоплатин+паклитаксел получили 56 пациенток, 14 – химиотерапию по схеме карбоплатин+паклитаксел+авастин, 9 – по схеме цисплатин+доксорубицин+циклофосфан, 6 пациенток получили карбоплатин в монорежиме и 1 – по схеме – цисплатин+циклофосфан.

2.4. Клинико-лабораторные методы обследования

Определение концентрации опухолевых маркеров СА-125 и НЕ-4 проводили на автоматическом электрохемилюминесцентном анализаторе (COBAS E601, фирма ROCHE, Швейцария).

Молекулярно-генетические исследования. Выбор микроРНК, ассоциированных с раком яичников, производили на основании анализа базы данных интернет-ресурса miRWalk2.0 (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de>). Затем проводили анализ на наличие CpG островков по базе данных Epigenomics (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>).

Уровни метилирования 14 генов микроРНК (*MIR-124a-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125b-1*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-132*, *MIR-137*, *MIR203A*, *MIR34B*, *MIR-34c*, *MIR-375*, *MIR9-1*, *MIR9-3*, *MIR-339*) исследованы в образцах ткани 26 опухолей больных РЯ, а также в 15 образцах гистологически неизмененных тканей яичников и в 19 образцах ткани перитонеальных метастазов. При этом для отбора проб с достаточным количеством опухолевых клеток (70-80% и более) выполняли контрольный гистологический анализ с шагом микросрезов 3-5 мкм и окрашиванием гематоксилином-эозином.

Выделение ДНК. Тотальную ДНК выделяли из образцов ткани яичников по стандартному фенол-хлороформному методу. Выделенная ДНК хранилась при температуре -20°C. Спектрофотометром NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, США) контролировали качество и концентрацию ДНК.

Анализ метилирования генов микроРНК методом МС-ПЦР с детекцией в реальном времени. Использовали бисульфитную конверсию ДНК 0,5-2 мкг. Модифицированная бисульфитом ДНК хранилась при -20°C и использовалась в качестве матрицы при проведении количественной МС-ПЦР в реальном времени с использованием набора реактивов «qPCRmix-HS SYBR» и по протоколу фирмы Евроген. Амплификацию проводили в системе Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System (США) в соответствии с прилагаемым к прибору протоколом.

Отсутствие продукта ПЦР на неконвертированной ДНК оценивалось для каждой пары праймеров. Для контроля неметилованных аллелей применяли специальный препарат ДНК #G1471 (Promega, США). Контроль позитивного 100% метилирования осуществляли препаратом ДНК #SD1131 (Thermo Scientific, США).

Выделение РНК. Тотальную РНК выделяли с помощью метода гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформенной экстракции. Концентрацию нуклеиновых кислот оценивали по оптической плотности на спектрофотометре NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific, США).

Определение экспрессии генов микроРНК методом TaqMan МС-ПЦР. После определения комплексной РНК производили реакцию обратной транскрипции с использованием TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Scientific, США) с целью получения комплементарной (кДНК). Полученную кДНК применяли для изучения уровня экспрессии генов микроРНК.

Определение концентрации sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови. Концентрацию sPD-L1 и sPD-1 измеряли в образцах плазмы крови здоровых доноров и больных РЯ, полученной по стандартной методике до начала специфического лечения, с помощью реактивов прямого иммуноферментного анализа Human PD-L1 Platinum ELISA и Human PD-1 ELISA kit (Affimetrix, eBioscience, США) согласно инструкциям производителя. Автоматическим иммуноферментным анализатором ВЕР 2000 Advance (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия) выполняли измерения. Уровень маркеров отображали в пикограммах (пг) на 1 мл плазмы крови.

Статистический анализ клинико-лабораторных данных. Выбор основных характеристик и статистических критериев при их сравнении осуществляли после изучения распределения признака и его сравнения с распределением Гаусса по критерию Колмогорова-Смирнова. Для признаков с распределением, значимо отличающимся от нормального, рассчитывали медиану, квартили и применяли непараметрические методы сравнения. Для несвязанных

признаков при количестве групп более двух, p рассчитывали с применением непараметрического варианта дисперсионного анализа Kruskal-Wallis ANOVA & Median test и Mann-Whitney U test при сопоставлении двух групп. Сравнения связанных значений выполняли с применением непараметрических методов анализа Wilcoxon matched pairs test и Kendall's concordance. Для расчета пороговых значений вычисляли 95% доверительные интервалы показателей. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Безрецидивная выживаемость рассчитана методом Kaplan-Meier. При сравнении частот строили таблицы сопряженности признаков. Для расчета p использовали точный критерий Фишера (при небольших объемах групп) и непараметрический критерий χ^2 . Проводили корреляционный анализ Spearman для непараметрических данных с расчетом коэффициента корреляции и уровня его значимости. В качестве параметра уровня метилирования использовали показатель индекса метилирования (ИМ), рассчитанный по формуле
$$\text{ИМ} = 100 \times \frac{\text{число метилированных копий гена (M)}}{\text{число метилированных копий гена (M)} + \text{число неметилированных копий гена (U)}}$$
 ИМ представляет собой непрерывное значение от 0 до 1 и может быть интерпретирован как процент метилирования. Для каждого парного образца был получен индекс метилирования. Достоверность полученных различий оценивали в программной среде R с применением непараметрических тестов (Mann-Whitney U test, критерий типа Колмогорова-Смирнова). Mann-Whitney U test используют для оценки различий между двумя независимыми выборками по уровню количественного признака, что позволяет выявлять различия в значении параметра между малыми выборками. Для всех статистических тестов значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

Все вычисления проводили на персональном компьютере с помощью математических пакетов «STATISTICA» и SPSS.

ГЛАВА 3. СОБСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Содержание маркера sPD-1 и его лиганда sPD-L1 в плазме крови больных опухолями яичников разных групп и в контроле

Распределение белков sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови обследованных женщин значительно отличалось от распределения Гаусса, в связи с этим в качестве центральной статистической меры изучаемых показателей выбрана медиана, в качестве меры разброса - квартили. В таблице 15 представлены данные по содержанию sPD-1 и sPD-L1 у больных разных групп и в контроле.

Таблица 15 – Содержание sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных новообразованиями яичников разных групп и в контроле

| Группа/ Маркер | N | Пределы | 95%ДИ | Медиана | Квартили | P (Kruskal-Wallis) |
|-----------------------|----|-----------|-----------|---------|-----------|--|
| sPD-1, пг/мл | | | | | | |
| ⁰ Контроль | 35 | 19,1-66,4 | 22,7-65,3 | 43,8 | 33,7-54,6 | $p_{0vs1}=0,004$; $p_{0vs2}=0,39$; $p_{0vs3}=0,32$; $p_{1vs3}=0,22$; $p_{2vs3}=0,12$; $p_{1vs2}=0,03$ |
| ¹ ДОЯ | 22 | 32,1-150 | 32,8-126 | 51,4 | 44,9-85,3 | |
| ² ПОЯ | 10 | 30,2-52,9 | 30,2-52,9 | 39,2 | 30,9-45,8 | |
| ³ ЗОЯ | 93 | 18,6-219 | 25,0-107 | 49,9 | 37,8-64,3 | |
| sPD-L1, пг/мл | | | | | | |
| ⁰ Контроль | 35 | 7,6-149 | 24,7-110 | 60,9 | 26,2-91,7 | $p_{0vs1}=0,004$; $p_{0vs2}=0,093$; $p_{0vs3}=0,37$; $p_{1vs3}=0,032$; $p_{2vs3}=0,23$; $p_{1vs2}=0,9$ |
| ¹ ДОЯ | 22 | 5,9-154 | 12,9-88,8 | 22,2 | 14,0-49,8 | |
| ² ПОЯ | 10 | 10,3-113 | 10,8-113 | 24,7 | 12,4-61,8 | |
| ³ ЗОЯ | 93 | 0-176 | 11,9-121 | 44,4 | 22,2-84,7 | |

Из данных таблицы 15 следует, что у больных опухолями яичников чаще наблюдали более высокую концентрацию sPD-1 в плазме крови, чем у женщин контрольной группы. Так, медиана sPD-1 в группе контроля равнялась 43,8 пг/мл

и была достоверно ниже, по сравнению с группой больных ДОЯ (51,4 пг/мл; $p=0,004$) и незначимо ниже, чем у больных ЗОЯ (49,9 пг/мл; $p=0,32$). При этом не выявили различий между концентрациями sPD-1 в группах больных ДОЯ и ЗОЯ ($p=0,22$). Наименьшая медиана показателя sPD-1 выявлена в группе больных ПОЯ, однако значимых различий с концентрациями в других группах не отмечено. Значимо различающихся пороговых уровней sPD-1, измеренных в плазме крови женщин разных групп, не найдено. Таким образом, маркер sPD-1 нельзя использовать как онкомаркер рака яичников, но высокий уровень маркера более 65 пг/мл (верхний 95% ДИ в контроле) может свидетельствовать об опухолевом заболевании яичников. Так, в группе больных ДОЯ их частота составила - 27,3%, в группе больных ЗОЯ - 23,7%, в общей группе больных опухолями яичников - 22,4%. Следовательно, примерно у каждой пятой больной с опухолью яичников отмечаются высокие (выше 65 пг/мл) показатели sPD-1, что не характерно для женщин группы контроля ($p=0,03$).

Указанный в таблице 15 анализ данных демонстрирует, что концентрации sPD-L1 в плазме крови статистически достоверно не отличались. Однако, при новообразованиях яичников значения маркера в половине наблюдений смещены в сторону меньших концентраций. Так, например, если в группе контроля медиана содержания лиганда была наибольшей (60,9 пг/мл), то в группе больных ДОЯ – достоверно меньшей (22,2 пг/мл, $p=0,004$), различия статистически значимы. Медиана sPD-L1 в группе больных ПОЯ (24,7 пг/мл) значимо не различалась от пациенток группы ДОЯ (22,2 пг/мл; $p>0,05$). В группе больных ЗОЯ медиана sPD-L1 (44,4 пг/мл) статистически значимо выше, по сравнению с больными группы ДОЯ ($p=0,032$), и незначимо ниже, чем в контроле.

Пороговых значений sPD-L1, статистически достоверно разделяющих обследованные группы, не обнаружили. Таким образом, sPD-L1, измеренный в плазме крови больных новообразованиями яичников, не может применяться как онкомаркер.

Анализ частоты выявления концентраций sPD-L1 менее 60 пг/мл (медиана в

контроле) показал, что в группе больных ДОЯ медиана маркера была наименьшей (18,2%, 4 из 22), возрастала до 30% (3 из 10) у больных ПОЯ и до 38,7% – у больных ЗОЯ (36 из 93) ($p=0,08$).

Рассчитали частоту одновременного выявления значений sPD-1 (порог 65 пг/мл) и sPD-L1 (порог 60 пг/мл) у обследованных женщин разных групп. Как следует из данных рисунка 4, для группы контроля были не характерны «высокие» концентрации sPD-1 при «низких» концентрациях sPD-L1 (2,9%), тогда как в группе больных ДОЯ их частота составила 22,7%, а в группе больных ЗОЯ – 12,9%. В группе контроля также редко выявляли «высокие» концентрации sPD-1 при «высоких» концентрациях sPD-L1 (2,9%), тогда как в группе больных ЗОЯ они обнаружены в 10,8%. Напротив, «низкие» значения sPD-1 при «высоких» концентрациях sPD-L1 обнаружили почти у половины здоровых женщин (48,6%) и только у 28% больных ЗОЯ и у 13,6% больных ДОЯ.

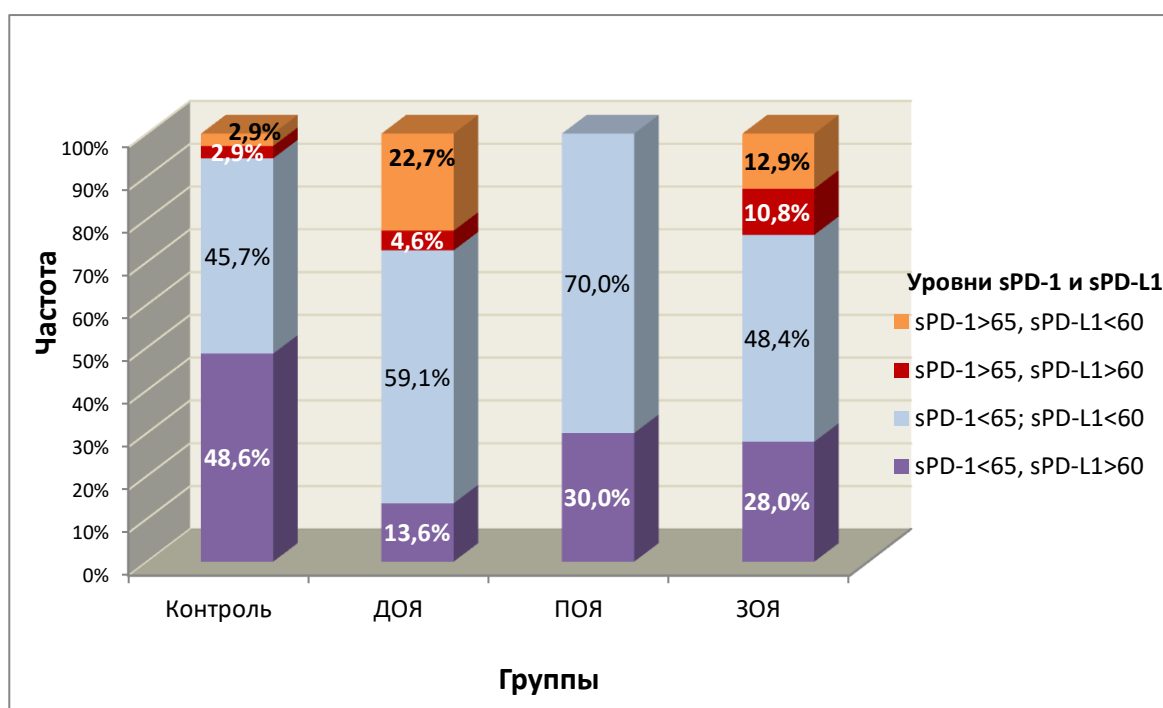


Рисунок 4 – Частота выявления различных уровней sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови практически здоровых женщин и больных опухолями яичников разных групп

Рассчитали соотношение sPD-1/sPD-L1 в плазме крови обследованных женщин разных групп. Результаты представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Соотношение sPD-1/sPD-L1 в плазме крови больных опухолями яичников разных групп и в контроле

| Группа | N | Пределы | 95%ДИ | Медиана | Квартили | P (Kruskal-Wallis ANOVA) |
|-----------------------|----|-----------|-----------|---------|-----------|---|
| sPD-1/sPD-L1, пг/мл | | | | | | |
| ⁰ Контроль | 35 | 0,27-5,9 | 0,31-4,78 | 0,77 | 0,44-1,83 | p _{0vs1} =0,0004; p _{0vs2} =0,18; p _{0vs3} =0,078; p _{1vs3} =0,007; p _{2vs3} =0,6; p _{1vs2} =0,2 |
| ¹ ДОЯ | 22 | 0,32-14,4 | 0,64-9,01 | 2,22 | 1,59-4,25 | |
| ² ПОЯ | 10 | 0,27-5,1 | 0,27-5,15 | 1,39 | 0,74-2,9 | |
| ³ ЗОЯ | 93 | 0,11-17,7 | 0,34-6,86 | 0,99 | 0,56-2,61 | |

Анализ данных, представленных в таблице 16, показал, что медиана соотношения sPD-1/sPD-L1 в плазме крови, в группе контроля достигала наименьшего показателя (медиана 0,77). Группы больных опухолями яичников характеризовались заметно бóльшим разбросом значений этого соотношения. При этом медиана соотношения sPD-1/sPD-L1 у больных ДОЯ была наибольшей и статистически значимо выше как по сравнению с контролем (p=0,0004), так и по сравнению с ЗОЯ (p=0,007).

Необходимо также отметить, что группы больных новообразованиями яичников различались по частоте выявления порогового значения соотношения sPD-1/sPD-L1, равного 1,2 (p=0,007). Так, частота выявления очень высоких значений соотношения sPD-1/sPD-L1 у больных ДОЯ равнялась 81,8% (18 из 22), у больных ПОЯ снижалась до 60% (6 из 10) и до 44,9% (40 из 93) у больных ЗОЯ, то есть в 1,8 раза. При этом, в группе контроля частота выявления очень высоких значений соотношения sPD-1/sPD-L1 была наименьшей и составила 34,3% (12 из

35) (Рисунок 5). Таким образом, соотношение sPD-1/sPD-L1 также не обладает необходимой информативностью для разделения обследованных групп больных и контроля.

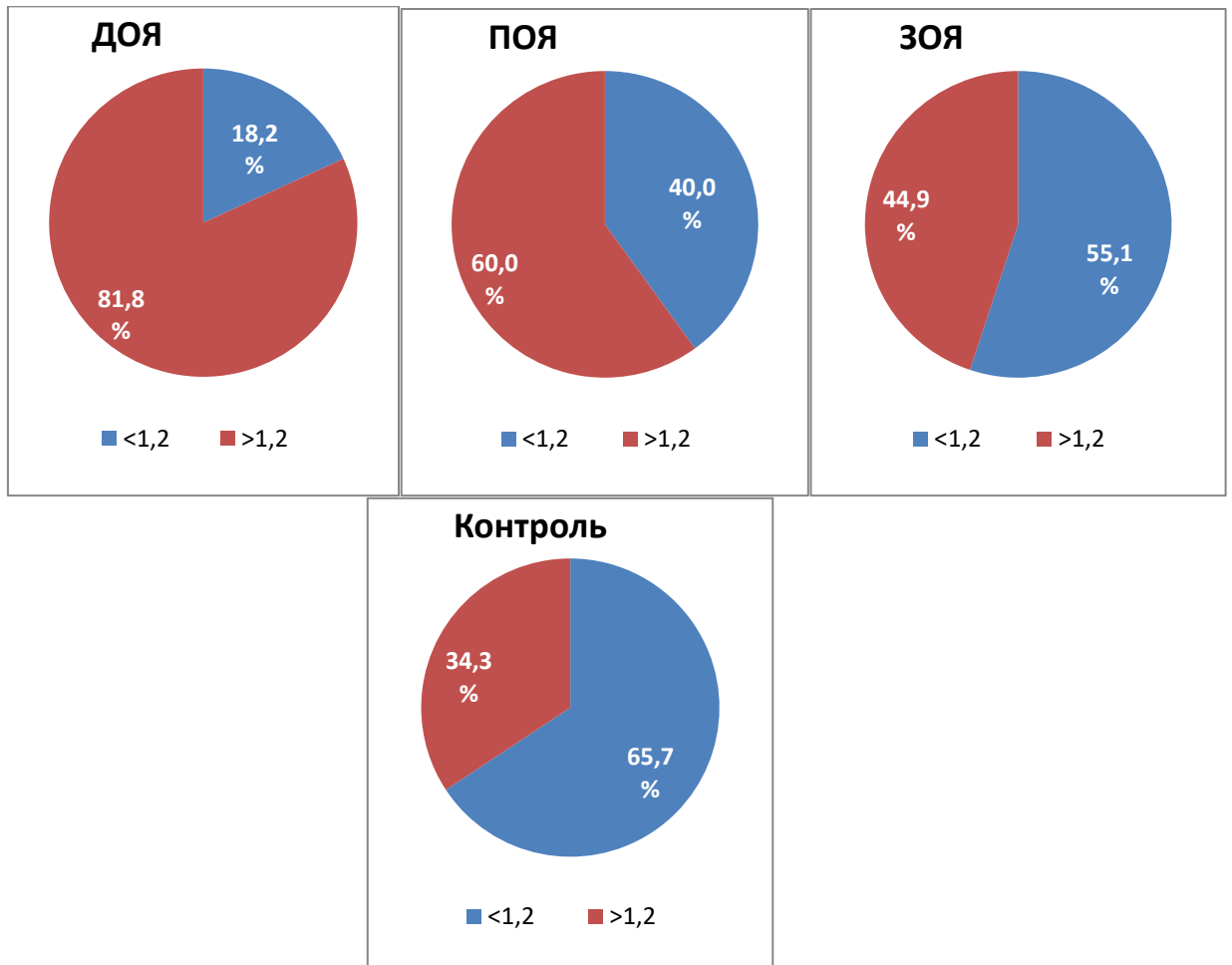


Рисунок 5 – Частота выявления высоких значений соотношения sPD-1/sPD-L1 в плазме крови практически здоровых женщин и больных образованиями яичников

3.2. Связь sPD-1 и sPD-L1 плазмы крови с данными анамнеза обследованных больных и группы контроля

Анализ корреляционной зависимости между уровнями sPD-1, sPD-L1, соотношением sPD-1/sPD-L1, исследованных в плазме крови женщин разных групп, с их возрастом (Таблица 17). Не установлено корреляционной зависимости исследованных показателей с возрастом больных и здоровых женщин.

Таблица 17 – Корреляционная зависимость между уровнями sPD-1, sPD-L1 и соотношения sPD-1/sPD-L1 плазмы крови и возрастом обследованных женщин

| Группа | Показатели | r_s | P |
|---------------------------------|------------------------|-------|-------|
| ⁰ Контроль (n=35) | sPD-1 - возраст | -0,15 | >0,05 |
| | sPD-L1 - возраст | -0,10 | >0,05 |
| | sPD-1/sPD-L1 - возраст | 0,09 | >0,05 |
| ¹ ДОЯ (n=22) | sPD-1 - возраст | -0,19 | >0,05 |
| | sPD-L1 - возраст | -0,19 | >0,05 |
| | sPD-1/sPD-L1 - возраст | 0,18 | >0,05 |
| ² ПОЯ (n=10) | sPD-1 - возраст | -0,12 | >0,05 |
| | sPD-L1 - возраст | -0,07 | >0,05 |
| | sPD-1/sPD-L1 - возраст | -0,06 | >0,05 |
| ³ ЗОЯ (n=93) | sPD-1 - возраст | 0 | >0,05 |
| | sPD-L1 - возраст | 0,23 | 0,026 |
| | sPD-1/sPD-L1 - возраст | 0,14 | >0,05 |

Дисперсионный анализ не показал статистически значимой связи изучаемых белков с возрастом обследованных женщин всех групп. Следует отметить, что во всех группах наблюдали наибольшие медианы sPD-1 у пациенток в возрасте моложе 30 лет и, напротив, наименьшие – в возрасте от 31 до 50 лет, в этой связи группы были объединены (Таблица 18).

Таблица 18 – Содержание sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных новообразованиями яичников разных групп и в контроле в зависимости от возраста

| Группы | Возраст, лет | N | sPD-1, пг/мл | | sPD-L1, пг/мл | |
|----------|--------------|----|--------------|-----------|---------------|-----------|
| | | | Медиана | Квартили | Медиана | Квартили |
| Контроль | < 30 | 6 | 59,9 | 57,0-64,3 | 35,6 | 30,2-99,4 |
| | 31-50 | 18 | 35,5 | 28,9-43,8 | 73,1 | 43,9-97,0 |
| | 51 и более | 11 | 49,1 | 43,6-54,6 | 26,2 | 24,7-78,1 |

Продолжение таблицы 1

| | | | | | | |
|-----|------------|----|-------|-----------|-------|-----------|
| ДОЯ | < 30 | 4 | 56,6 | 55,7-85,3 | 62,1 | 5,9-67,7 |
| | 31-50 | 7 | 48,8 | 45,6-63,0 | 21,7 | 12,9-54,6 |
| | 51 и более | 11 | 47,1 | 41,4-85,8 | 22,2 | 14,0-29,7 |
| ПОЯ | < 30 | 1 | 52,7* | - | 18,1* | - |
| | 31-50 | 5 | 39,2 | 30,9-39,8 | 8,7 | 24,7-32,2 |
| | 51 и более | 4 | 34,6 | 30,4-45,8 | 10,8 | 10,3-61,8 |
| ЗОЯ | < 30 | - | - | - | - | - |
| | 31-40 | 8 | 41,8 | 37,1-52,3 | 48,8 | 26,7-66,1 |
| | 41-50 | 22 | 40,4 | 33,2-50,3 | 35,1 | 17,9-60,4 |
| | 51-60 | 36 | 53,6 | 44,9-62,3 | 44,4 | 12,4-84,7 |
| | 61-70 | 19 | 55,0 | 33,2-78,8 | 53,6 | 22,2-88,8 |
| | 71 и более | 8 | 48,1 | 46,1-68,8 | 23,7 | 13,5-99,4 |

Примечание: * – абсолютное значение; все различия между возрастными подгруппами статистически не значимы.

Таким образом, можно сделать заключение, что концентрации sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных ЗОЯ не связаны с возрастом. Остальные группы были малочисленны, чем и могут объясняться наблюдаемые различия концентраций изучаемых показателей в возрастных подгруппах.

Анализ полученных результатов не выявил связи репродуктивного статуса больных ЗОЯ с исходным уровнем изучаемых маркеров (медиана sPD-1 равнялась 48,1 пг/мл в группе репродуктивного возраста, а в менопаузе составила 51,9 пг/мл, $p > 0,05$; медианы sPD-L1 были 42,0 и 37,3 пг/мл соответственно, $p > 0,05$).

Рассчитали концентрации sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных новообразованиями яичников в группах с различным возрастом наступления менархе (Таблица 19).

Таблица 19 – Содержание sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных новообразованиями яичников разных групп в зависимости от возраста наступления менархе

| Группы | Возраст, лет | N | sPD-1, пг/мл | | sPD-L1, пг/мл | |
|--------|--------------|----|--------------|-----------|---------------|-----------|
| | | | Медиана | Квартили | Медиана | Квартили |
| ДОЯ | 10-12 | 10 | 51,4 | 48,8-61,8 | 23,2 | 21,7-62,1 |
| | 13 и более | 12 | 47,1 | 41,4-85,3 | 15,5 | 12,9-32,2 |
| ПОЯ | 10-12 | 3 | 39,8 | 30,9-45,8 | 61,8 | 28,7-113 |
| | 13 и более | 7 | 34,6 | 30,4-52,7 | 12,4 | 10,8-32,2 |
| ЗОЯ | 10-12 | 43 | 53,6 | 41,8-65,8 | 42,5 | 23,5-64,7 |
| | 13 и более | 50 | 48,1 | 37,8-64,3 | 37,3 | 15,5-60,4 |

Примечание: все различия статистически незначимы ($p > 0,05$).

В группах больных новообразованиями яичников с ранним менархе выявлены несколько бóльшие медианы как sPD-1, так и sPD-L1, однако все наблюдаемые различия были статистически не значимы.

Не установлено связи концентраций sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных новообразованиями яичников в группах с наличием в анамнезе родов (Таблица 20).

Таблица 20 – Содержание sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных новообразованиями яичников разных групп в зависимости от наличия или отсутствия родов в анамнезе

| Группы | Роды | N | sPD-1, пг/мл | | sPD-L1, пг/мл | |
|--------|------|----|--------------|-----------|---------------|-----------|
| | | | Медиана | Квартили | Медиана | Квартили |
| ДОЯ | Нет | 4 | 55,7 | 40,3-56,6 | 22,2 | 14,0-67,7 |
| | Есть | 18 | 51,4 | 45,6-85,3 | 21,7 | 13,9-29,7 |
| ПОЯ | Нет | 1 | 39,2* | - | 24,7* | - |
| | Есть | 9 | 39,8 | 30,9-45,8 | 28,7 | 12,4-61,8 |

Продолжение таблицы 20

| | | | | | | |
|-----|------|----|------|-----------|------|-----------|
| ЗОЯ | Нет | 9 | 41,8 | 39,5-47,9 | 40,6 | 37,9-48,8 |
| | Есть | 84 | 51,9 | 38,3-65,8 | 37,3 | 17,6-64,7 |

Примечание: все различия незначимы ($p > 0,05$).

Не установлено связи концентраций sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных новообразованиями яичников в группах с наличием в анамнезе аборт (Таблица 21).

Таблица 21 – Содержание sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных новообразованиями яичников разных групп в зависимости от количества аборт в анамнезе

| Группы | Аборты | N | sPD-1, пг/мл | | sPD-L1, пг/мл | |
|--------|-----------|----|--------------|-----------|---------------|-----------|
| | | | Медиана | Квартили | Медиана | Квартили |
| ДОЯ | Нет | 9 | 51,4 | 45,6-56,6 | 28,7 | 22,2-67,7 |
| | 1-3 | 11 | 41,4 | 41,4-85,3 | 20,2 | 11,9-29,7 |
| | 4-6 | 2 | 63,0 | 63-150 | 12,9 | 12,9-54,6 |
| ПОЯ | Нет | 6 | 39,2 | 34,6-45,8 | 24,7 | 18,1-79,5 |
| | 1-3 | 3 | 39,8 | 30,4-52,9 | 10,8 | 10,8-28,7 |
| | 4-6 | 1 | 30,2* | - | 32,2* | - |
| ЗОЯ | Нет | 44 | 46,1 | 37,8-58,1 | 42,0 | 24,7-53,2 |
| | 1-3 | 39 | 58,0 | 44,9-71,0 | 35,1 | 13,5-71,9 |
| | 4-6 | 7 | 45,8 | 35,8-66,3 | 35,1 | 9,2-46,9 |
| | 7 и более | 3 | 49,7 | 48,1-136 | 37,3 | 23,5-99,4 |

Примечание: все различия незначимы ($p > 0,05$).

Наличие выкидышей также не было связано с содержанием изучаемых показателей у больных ЗОЯ (медиана sPD-1 равнялась 49,9 пг/мл в группе без таковых и 51,2 пг/мл с таковыми, $p > 0,05$; медиана sPD-L1 равнялась 40,5 пг/мл в

группе без таковых и 35,1 пг/мл с таковыми, $p>0,05$). Содержание изучаемых плазменных показателей у больных ЗОЯ не отражало наличие гинекологических заболеваний (медиана sPD-1 равнялась 50,3 пг/мл в группе без таковых и 49,9 пг/мл с таковыми, $p>0,05$; медианы sPD-L1 равнялись 35,1 и 36,1 пг/мл соответственно, $p>0,05$). Пациентки из группы ЗОЯ без сопутствующих заболеваний имели наиболее высокие медианы как sPD-1, так и sPD-L1 ($p=0,02$) независимо от вида сопутствующего заболевания (Таблица 22). Данный факт может объясняться тем обстоятельством, что в группе больных ЗОЯ без сопутствующих заболеваний только 72,7% пациенток были с III-IV стадиями рака яичников, тогда как в группе пациенток с сопутствующими патологиями – 48,1%, почти в 2 раза реже.

Таблица 22 – Содержание sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных злокачественными опухолями яичников в зависимости от наличия или отсутствия сопутствующих заболеваний в анамнезе

| Группы | Сопутствующие заболевания | N | sPD-1, пг/мл | | sPD-L1, пг/мл | |
|--------|---------------------------|----|--------------|-----------|---------------|-----------|
| | | | Медиана | Квартили | Медиана | Квартили |
| ЗОЯ | Нет | 35 | 62,3 | 44,9-66,3 | 60,4 | 37,9-97,9 |
| | Есть | 58 | 49,0 | 35,8-60,3 | 35,1 | 15,5-49,8 |
| P | | | 0,06 | | 0,02 | |

Таким образом, концентрации sPD-1, sPD-L1, измеренные в плазме крови больных ЗОЯ, практически не были связаны с данными анамнеза.

3.3. Связь концентраций sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных раком яичников с основными клиническими характеристиками заболевания

Изучили содержание маркеров sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных ЗОЯ со стадией заболевания по FIGO, фактором, наиболее полно характеризующим распространенность опухолевого процесса (Таблица 23). Следует отметить

тенденцию к повышению концентрации sPD-L1 в плазме крови больных ЗОЯ при увеличении распространенности процесса ($p=0,15$). Так, уровень sPD-L1 у больных РЯ с Ic стадией (медиана 16,1 пг/мл) был достоверно ниже, чем у больных РЯ с IIIc стадией (медиана 59,6 пг/мл, $p=0,04$) и особенно по сравнению с группой пациенток с IV стадией опухолевого процесса (медиана 82,0 пг/мл, $p=0,005$).

Таблица 23 – Концентрации sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных раком яичников и стадия заболевания по FIGO

| Стадия | N | sPD-1, пг/мл | | sPD-L1, пг/мл | |
|--------|----|--------------|-----------|---|-----------|
| | | Медиана | Квартили | Медиана | Квартили |
| Ia | 3 | 60,3 | 37,8-71,0 | 66,2 | 0-77,1 |
| Ib | 1 | 49,0* | - | 17,9* | - |
| Ic | 19 | 39,5 | 33,2-50,1 | 16,1 | 7,0-46,9 |
| IIa | - | - | - | - | - |
| IIb | 4 | 51,2 | 40,7-53,6 | 15,5 | 12,4-42,0 |
| IIc | 6 | 56,5 | 49,7-61,9 | 20,4 | 5,9-37,3 |
| IIIa | 6 | 44,9 | 42,1-71,5 | 42,5 | 31,1-83,5 |
| IIIb | 7 | 45,8 | 25,0-64,7 | 25,3 | 11,9-106 |
| IIIc | 42 | 50,3 | 37,8-70,6 | 59,6 | 37,9-105 |
| IV | 5 | 69,5 | 55,2-78,8 | 82,0 | 79,5-88,8 |
| P | | >0,05 | | $p=0,15$; $Ic_{vs}IIIc=0,04$; $Ic_{vs}IV=0,0045$ | |

Примечание: * – абсолютное значение.

Более четко тенденция к изменению концентрации sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных ЗОЯ отмечена при группировке малочисленных групп (Таблица 24).

Таблица 24 – Связь концентраций sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных раком яичников со стадией заболевания

| Стадия | N | sPD-1, пг/мл | | sPD-L1, пг/мл | |
|----------------------------|----|---|-----------|---|-----------|
| | | Медиана | Квартили | Медиана | Квартили |
| ¹ Ia, Ib, Ic | 23 | 42,9 | 35,1-51,9 | 17,9 | 7,0-53,2 |
| ² IIa, IIb, IIc | 10 | 53,6 | 49,7-60,9 | 20,4 | 12,4-42,0 |
| ³ IIIa, IIIb | 13 | 45,8 | 40,6-68,0 | 36,1 | 23,5-83,5 |
| ⁴ IIIc | 42 | 50,3 | 37,8-70,6 | 59,6 | 37,9-105 |
| ⁵ IV | 5 | 69,5 | 55,2-78,8 | 82,0 | 79,5-88,8 |
| P | | p=0,06; p _{1vs4} =0,09; p _{1vs5} =0,006; p _{3vs5} =0,09 | | p=0,0001; p _{1vs4} <0,0001; p _{1vs5} =0,0016; p _{2vs4} =0,0037; p _{2vs5} =0,004; p _{3vs5} =0,042 | |

Так, в группе из 23 больных ЗОЯ с начальными стадиями распространения заболевания (Ia, Ib, Ic стадии) медиана маркера sPD-1 равнялась 42,9 пг/мл. В группе из 10 больных с IIa, IIb стадиями медиана маркера повышалась до значения 53,6 пг/мл при сопоставимом разбросе показателя. В группе из 13 больных ЗОЯ с IIIa, IIIb стадиями разброс показателей маркера составил 45,8 пг/мл и его медиана не отличалась от таковой в группе с наименьшим распространением процесса. В группе из 42 пациенток с IIIc стадией медиана sPD-1 также была сопоставимой и равнялась 50,3 пг/мл и только в малочисленной группе больных с IV стадией наблюдали статистически значимое увеличение медианы sPD-1 (69,5 пг/мл, p=0,006).

В тоже время, обнаружено статистически высокозначимое повышение концентраций sPD-L1 в плазме крови больных ЗОЯ при увеличении распространенности опухолевого процесса с 17,9 до 82,0 пг/мл (p=0,0001).

Важно отметить, что частота выявления «высоких» значений sPD-1 >65 пг/мл, не характерных для контроля в выше указанных группах равнялась 8,7% (n=2); 10,0% (n=1); 30,8% (n=4); 28,6% (n=12) и 60,0% (n=3) (p=0,033). Таким образом, при увеличении стадии рака яичников обнаружено статистически

значимое повышение частоты выявления значений sPD-1 в плазме крови, превышающих верхний его порог в контроле (Рисунок 6).

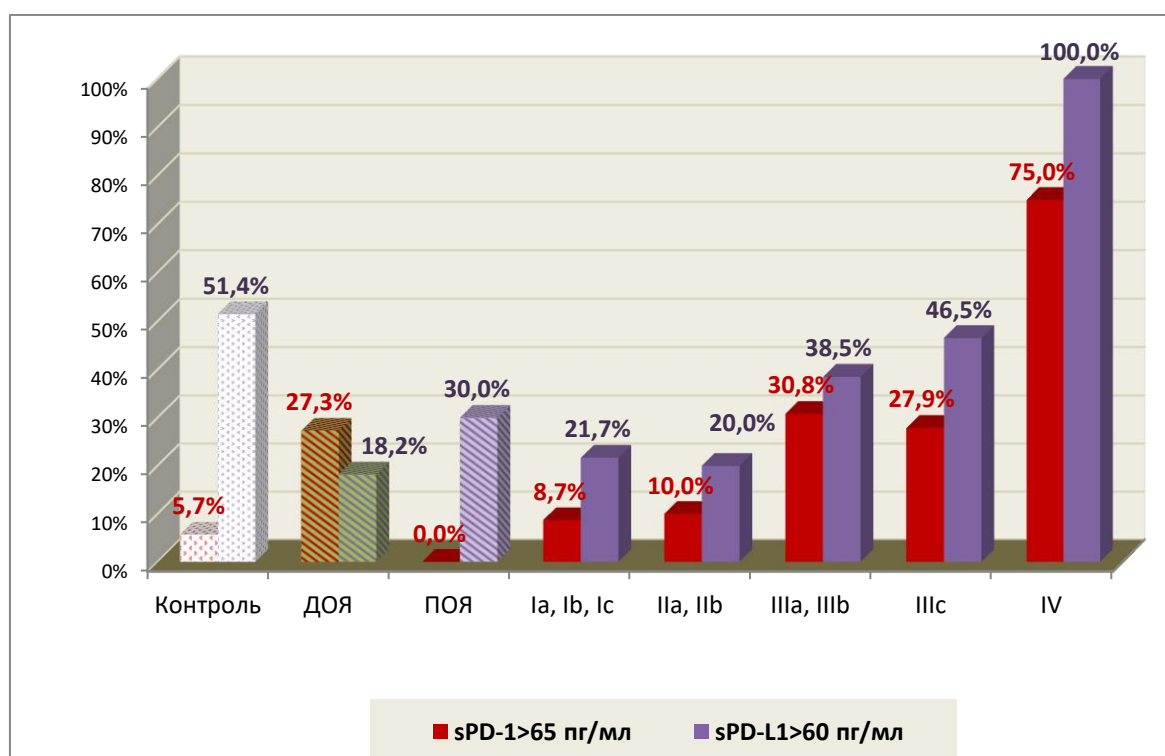


Рисунок 6 – Частота выявления «высоких» уровней sPD-1, а также sPD-L1 в плазме крови больных ЗОЯ разных стадий, больных ПОЯ и ДОЯ, а также в контроле

Аналогичная зависимость отмечена нами при анализе частоты выявления значений sPD-L1 ≥ 60 пг/мл в плазме крови больных ЗОЯ. Так, при увеличении стадии рака яичников частота выявления уровней sPD-L1 ≥ 60 пг/мл статистически значимо повышалась с 20,0-21,7% при I-II стадиях до 46,5% при IIIc стадии и до 100% при IV стадии ($p=0,02$).

Таким образом, концентрации изучаемых маркеров, определенных в плазме крови пациенток ЗОЯ различной степени распространенности, характеризуются большим разбросом значений (Рисунок 7).

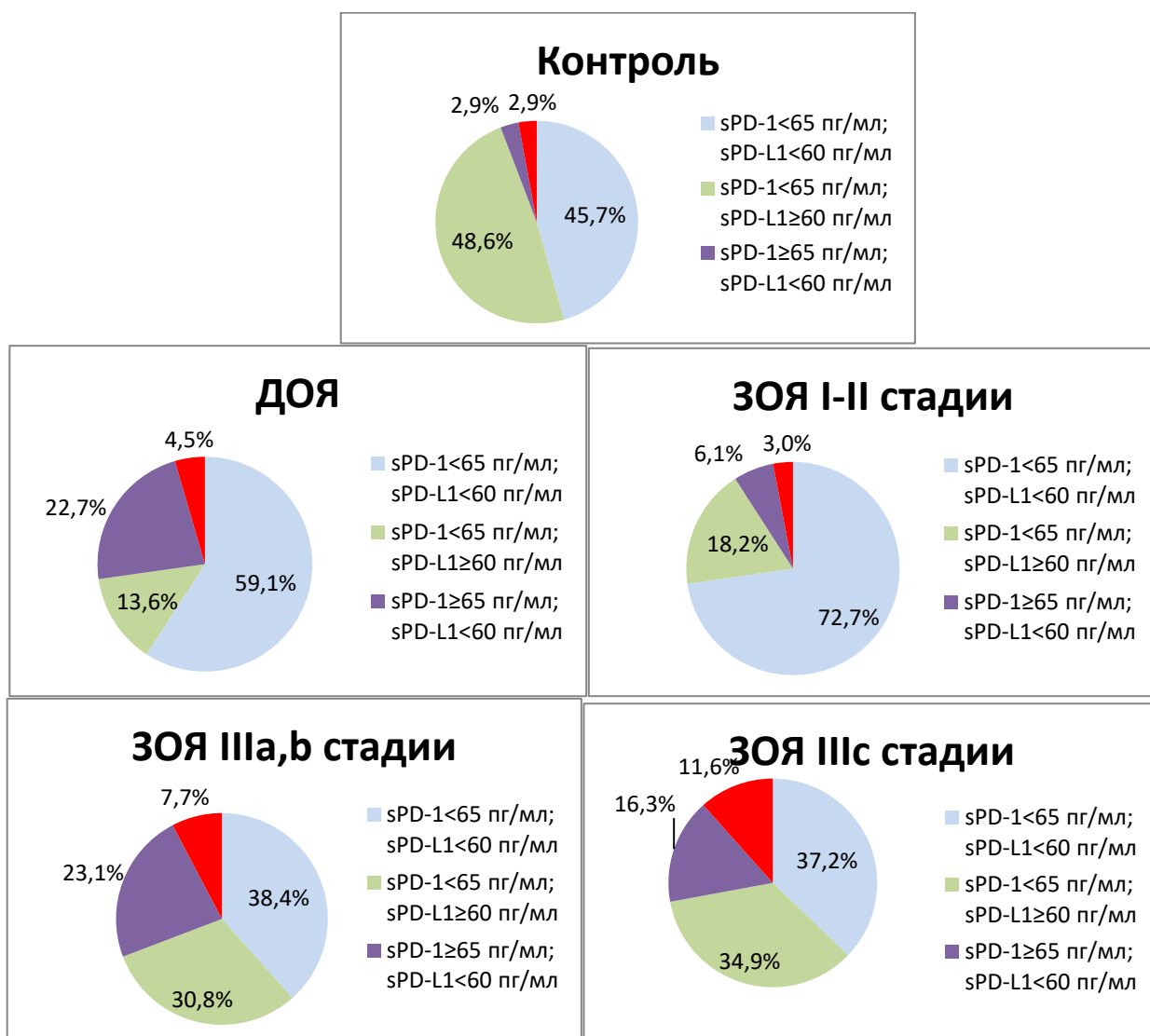


Рисунок 7 – Частота выявления совместных значений sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных злокачественными опухолями яичников при различном критерии распространенности опухолевого процесса

На рисунке 7 представлены частоты одновременного выявления «высоких» значений sPD-1, sPD-L1 при различных стадиях заболевания (стадия IV не представлена из-за малочисленности). Как следует из данных рисунка 7, структура одновременного выявления «высоких» и «низких» концентраций маркеров у больных ДОЯ и ЗОЯ с I-II стадиями различалась несущественно. В то же время IIIa, IIIb стадии характеризовалась увеличением доли одновременно «высоких» значений белков до 7,7% при сокращении одновременно «низких» значений до 38,4%. Стадия IIIc характеризовалась увеличением доли одновременно «высоких» значений белков до 11,6%. В группе из 5 больных с IV

стадией у 3 (60%) выявлены одновременно «высокие» концентрации и sPD-1 и sPD-L1, одновременно «низкие» значения исследованных маркеров не обнаружены (0%).

В таблице 25 представлены расчеты соотношения изучаемых показателей у больных раком яичников разных стадий (сгруппированных), а также выполнено их сопоставление с контролем и другими группами.

Таблица 25 – Соотношение sPD-1/sPD-L1 у больных новообразованиями яичников и в контроле

| Стадия | N | ³ Больные ЗОЯ (n=89) | ⁰ Контроль (n=35) | | ¹ ДОЯ (n=22) | |
|-------------------------------------|--|------------------------------------|---------------------------------|--------|----------------------------|--------|
| | | Медиана; квартили | Медиана; квартили | P | Медиана; квартили | P |
| ⁰ Пограничные опухоли | 10 | 1,4; 0,7-2,9 | 0,8; 0,4-1,8 | >0,05 | 2,2; 1,6-4,3 | 0,13 |
| ¹ Ia, Ib, Ic | 23 | 1,2; 0,7-3,6 | 0,8; 0,4-1,8 | 0,02 | 2,2; 1,6-4,3 | >0,05 |
| ² IIa, IIb, IIc | 10 | 2,9; 1,0-4,3 | 0,8; 0,4-1,8 | 0,0006 | 2,2; 1,6-4,3 | >0,05 |
| ³ IIIa, IIIb | 13 | 1,2; 0,5-2,6 | 0,8; 0,4-1,8 | >0,05 | 2,2; 1,6-4,3 | 0,08 |
| ⁴ IIIc | 42 | 0,9; 0,5-1,8 | 0,8; 0,4-1,8 | >0,05 | 2,2; 1,6-4,3 | 0,0008 |
| ⁵ IV | 5 | 0,8; 0,7-0,9 | 0,8; 0,4-1,8 | >0,05 | 2,2; 1,6-4,3 | 0,046 |
| P | ${}^0_{vs1}=0,02;$ ${}^0_{vs2}=0,037;$ ${}^1_{vs3}=0,011;$ ${}^2_{vs3}=0,021$ | | | | | |

Важно отметить, что медиана соотношения изучаемых маркеров в группе больных раком яичников с IV стадией не отличалась от таковой в группе практически здоровых женщин (0,8), но была значимо выше в группе больных с I стадией (1,2) и особенно с II стадией (2,9) (Рисунок 8).

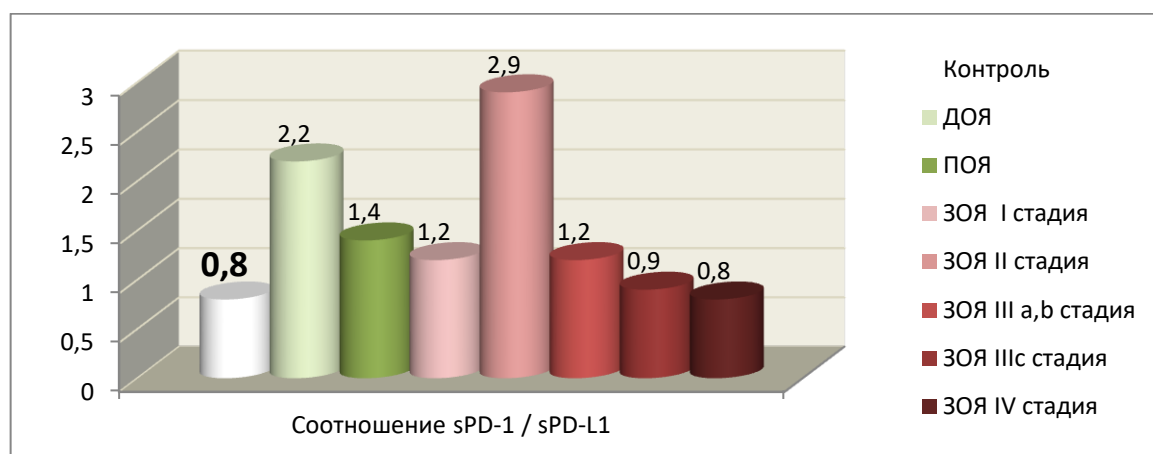


Рисунок 8 – Медиана соотношения sPD-1/sPD-L1 в плазме крови у обследованных женщин разных групп

Изучили изменение концентраций sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных ЗОЯ в группах с учетом критерия распространенности Т (Таблица 26). В малочисленных подгруппах сопоставление не проводили, однако при сравнении концентраций sPD-L1 в подгруппах Т1с с Т3с различия медиан были высокозначимы (16,1 и 71,2 пг/мл соответственно; $p < 0,0001$). Статистически значимые различия медиан в указанных подгруппах обнаружены и для sPD-1 (39,5 и 50,8 пг/мл соответственно; $p = 0,031$).

Таблица 26 – Связь концентраций sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных раком яичников с критерием распространенности Т (система TNM)

| Критерий Т | N | sPD-1, пг/мл | | sPD-L1, пг/мл | |
|------------|----|--------------|-----------|---------------|-----------|
| | | Медиана | Квартили | Медиана | Квартили |
| T1a | 3 | 60,3 | 37,8-71,0 | 66,1 | 0-77,1 |
| T1b | 1 | 49,0* | - | 17,9* | - |
| T1c | 19 | 39,5 | 33,2-50,1 | 16,1 | 7,0-46,9 |
| T2a | 1 | 139* | 37,8-70,6 | 31,7* | |
| T2b | 4 | 51,2 | 40,7-53,6 | 15,5 | 12,4-42,0 |
| T2c | 7 | 56,5 | 33,2-61,9 | 23,7 | 5,9-59,6 |
| T3a | 7 | 56,3 | 44,9-68,0 | 42,5 | 26,2-60,4 |

| | | | | | |
|-----|----|---|-----------|--|-----------|
| T3b | 7 | 45,8 | 40,6-65,0 | 23,5 | 11,9-36,1 |
| T3c | 44 | 50,8 | 40,1-70,8 | 71,2 | 43,3-108 |
| P | | T1 _c _{vs} T3c=0,031 | | T1 _c _{vs} T3c<0,0001 | |

Примечание: * – абсолютное значение.

В подгруппах, объединенных по критерию распространенности T получены следующие результаты (Таблица 27). Концентрации sPD-1 в плазме крови были заметно меньше только при распространенности T1. При этом частота выявления «высоких» значений sPD-1 >65 пг/мл увеличивалась с 8,7% (2 из 23) при T1 до 16,7% (2 из 12) при T2, до 21,4% (3 из 14) при T3a,b и достигала 31,8% (14 из 44) при T3c (p=0,16) (Рисунок 9).

Показатель sPD-L1 статистически значимо повышался в плазме крови больных раком яичников только при критерии T3c. При этом частота выявления «высоких» значений sPD-L1 >60 пг/мл увеличивалась с 21,7% (5 из 23) при T1 и 16,7% (2 из 12) при T2, до 21,4% (3 из 14) при T3a,b и достигала 52,3% (23 из 44) при T3c (p=0,02).

Таблица 27 – Концентрации sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных раком яичников с учетом критерия распространенности T (система TNM)

| Критерий T | N | sPD-1, пг/мл | | sPD-L1, пг/мл | |
|---------------|----|----------------------------|-----------|--|-----------|
| | | Медиана | Квартили | Медиана | Квартили |
| T1a, T1b, T1c | 23 | 42,9 | 35,1-51,9 | 17,9 | 7,0-53,2 |
| T2a, T2b, T2c | 12 | 53,6 | 40,7-60,9 | 23,7 | 12,4-42,0 |
| T3a, T3b | 14 | 53,0 | 42,1-68,0 | 26,2 | 21,2-60,4 |
| T3c | 44 | 50,8 | 40,1-70,8 | 71,2 | 43,3-108 |
| P | | T1 _{vs} T3c=0,046 | | T1 _{vs} T3c<0,0001; T2 _{vs} T3c=0,001; T3a,b _{vs} T3c=0,016 | |

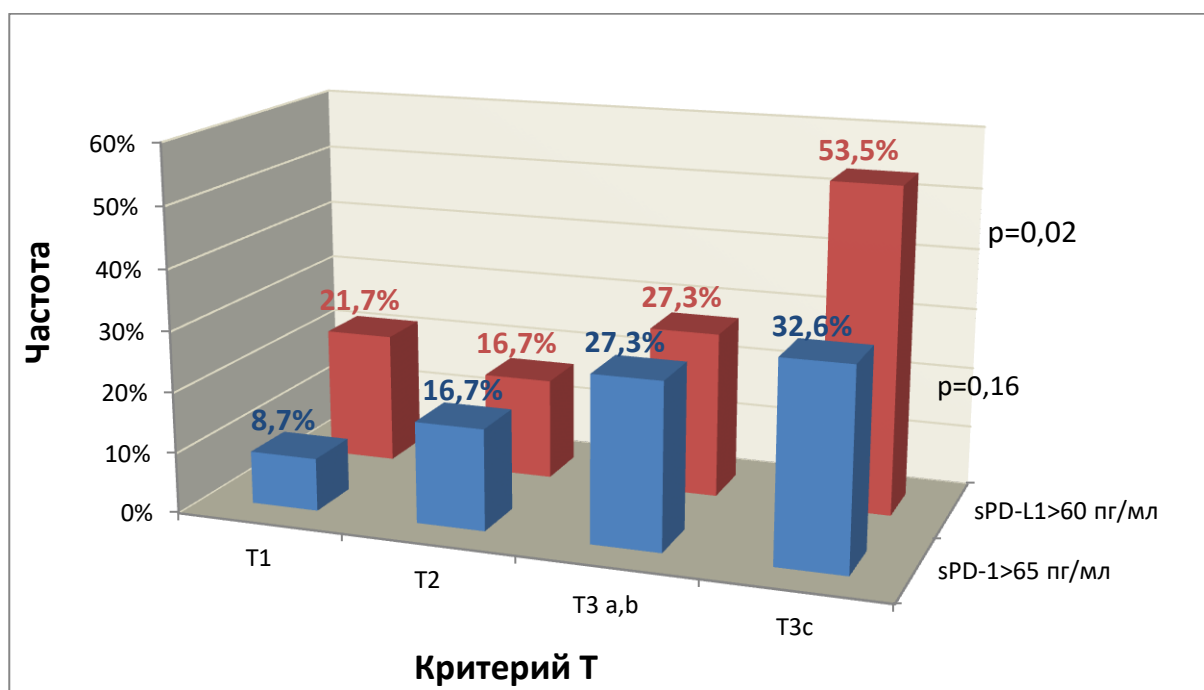


Рисунок 9 – Частота выявления значений sPD-1 >65пг/мл и sPD-L1 ≥60 пг/мл в плазме крови больных злокачественными опухолями яичников с учетом критерия распространенности Т

На рисунке 10 представлено изменение частоты выявления совместных уровней изучаемых маркеров в плазме крови больных ЗОЯ с различным критерием распространенности Т. Как видно из данных рисунка 9, увеличение одновременно «высоких» концентраций sPD-1, sPD-L1 наблюдали уже при T3a,b стадиях (до 9,1%), а при T3c стадии выявлена наибольшая их частота (18,6%) при одновременном снижении доли одновременно низких значений белков до 32,5%.

Установлено, что концентрация sPD-1 повышалась в плазме крови больных ЗОЯ только с отдаленными метастазами (медиана 69,5 пг/мл) по сравнению с группой пациенток без таковых (медиана 49,7 пг/мл) (сильная тенденция к различию медиан $p=0,05$) (Таблица 28). В то же время концентрации sPD-1 в группе пациенток с наличием метастазов в регионарных лимфоузлах были сопоставимы с концентрациями маркера без таковых.

Медианы концентрации sPD-L1 статистически незначимо повышались как при выявлении критерия N1 (с 43,3 до 59,6 пг/мл), так и статистически значимо при выявлении критерия М (с 42,5 до 88,8 пг/мл, более чем в 2 раза, $p=0,017$).

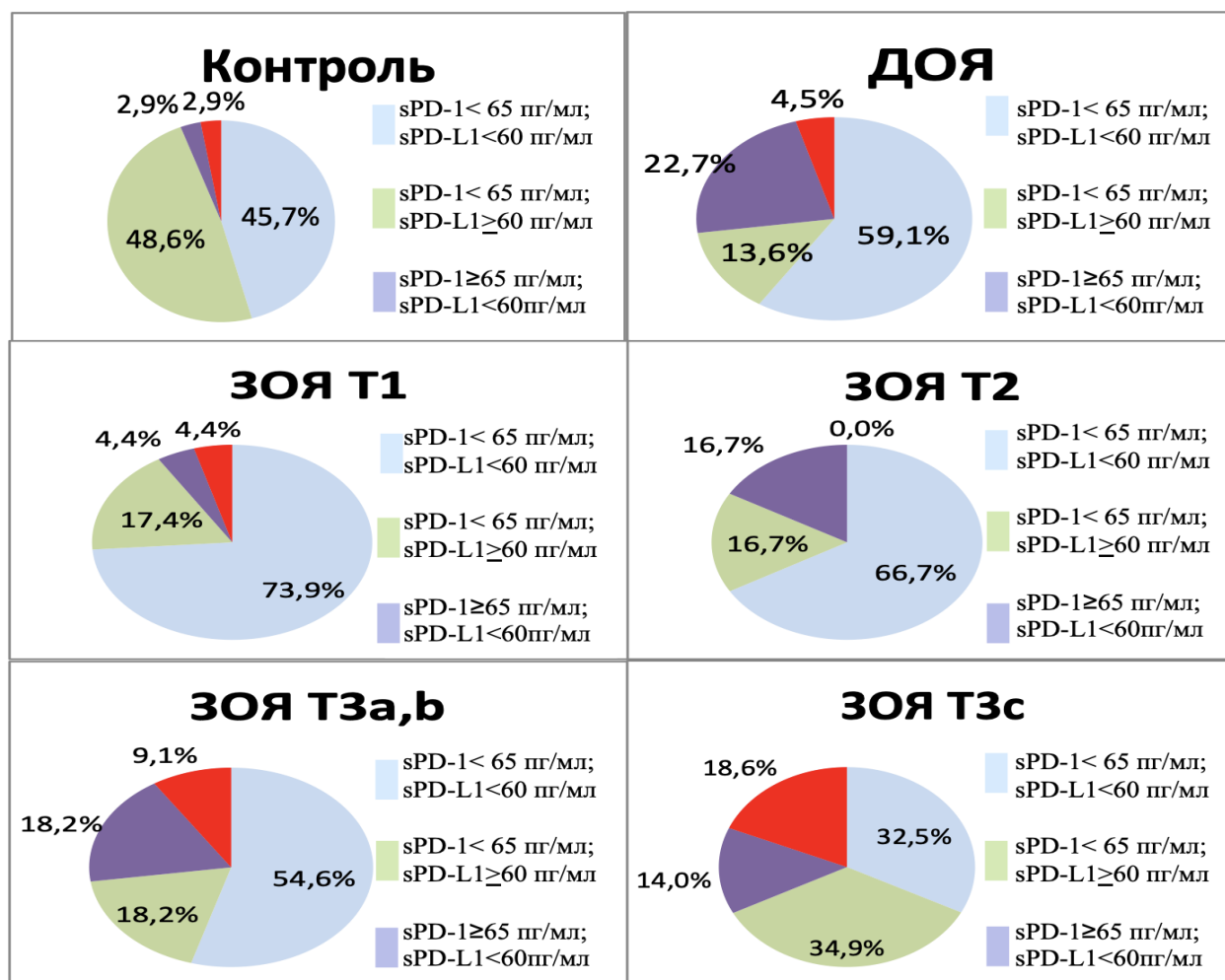


Рисунок 10 – Частота выявления совместных значений sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови пациенток при различном критерии распространенности Т

При этом многофакторный анализ также отметил статистически значимое влияние на повышение уровня sPD-L1 только критерия М ($p=0,039$).

Таблица 28 – Концентрации sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных раком яичников в зависимости от наличия метастазов

| Наличие метастазов | N | sPD-1, пг/мл | sPD-L1, пг/мл |
|--------------------------------|----|-------------------|-------------------|
| | | Медиана; квартили | Медиана; квартили |
| ⁰ N0M0 | 82 | 49,7; 37,8-62,3 | 42,5; 17,9-83,0 |
| ¹¹ N0M1, N1M0, N1M1 | 11 | 55,2; 40,1-78,8 | 82,0; 31,7-120 |

| | | | |
|--------------------------|---|--|---|
| ¹⁰ N1M0 | 6 | 40,1; 37,1-55,3 | 59,6; 30,6-82,0 |
| ⁰¹ N0M1, N1M1 | 5 | 69,5; 55,2-78,8 | 88,8; 82,0-99,4 |
| P | | $0_{vs11} > 0,05;$ $0_{vs10} > 0,05;$ $0_{vs01} = 0,052$ | $0_{vs11} = 0,028;$ $0_{vs10} > 0,05;$ $0_{vs01} = 0,014$ |

Анализ частоты выявления значений sPD-1 >65 пг/мл в плазме крови показал сопоставимые результаты в группах больных ЗОЯ с критерием N0 и N1 (соответственно 23,5%, 20 из 85 и 25%, 2 из 8), и статистически значимо различающиеся в группах с критерием M0 и M1 (соответственно 21,6%, 19 из 88 и 60,0%, 3 из 5) ($p=0,049$) (Рисунок 11).

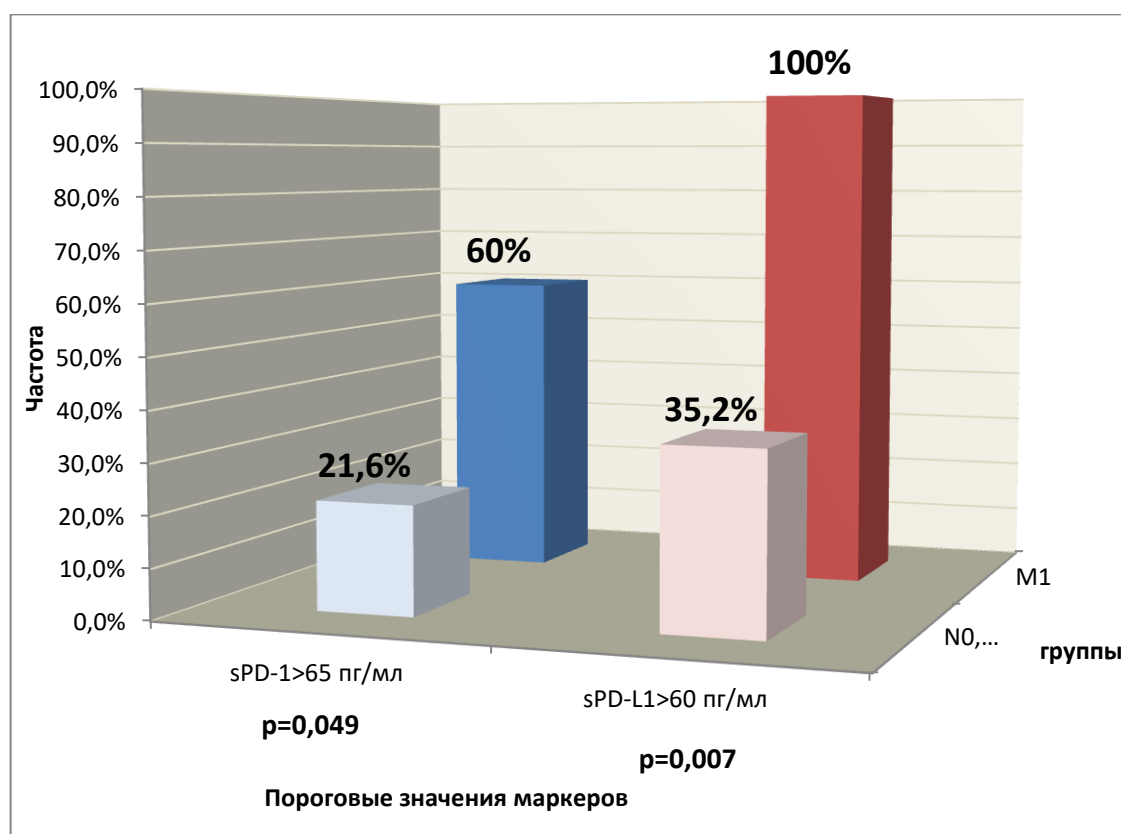


Рисунок 11 – Частота выявления «высоких» значений sPD-1 >65 пг/мл и sPD-L1 ≥60 пг/мл в группах больных злокачественными опухолями яичников с отсутствием и наличием отдаленных метастазов

Частота выявления значений sPD-L1 ≥ 60 пг/мл в группах больных раком яичников с критерием N0 и N1 составила соответственно 37,7%, 32 из 85 и 50%, 4 из 8, и статистически значимо различалась в группах с критерием M0 и M1 (соответственно 35,2%, 31 из 88 и 100,0%, 5 из 5) ($p=0,007$). Таким образом, следует считать, что маркеры sPD-1 и sPD-L1 плазмы крови больных ЗОЯ отражают критерий M.

Сопоставили также значения sPD-1, sPD-L1 плазмы крови в группах больных раком яичников с отсутствием и наличием отдаленных метастазов с уровнями показателей в контроле у практически здоровых женщин и у больных ДОЯ (Рисунок 12). При этом, медиана sPD-1 у больных раком яичников с M1 при сравнении с контрольной группой была статистически значимо выше (69,5 пг/мл против 43,8 пг/мл, $p=0,007$).

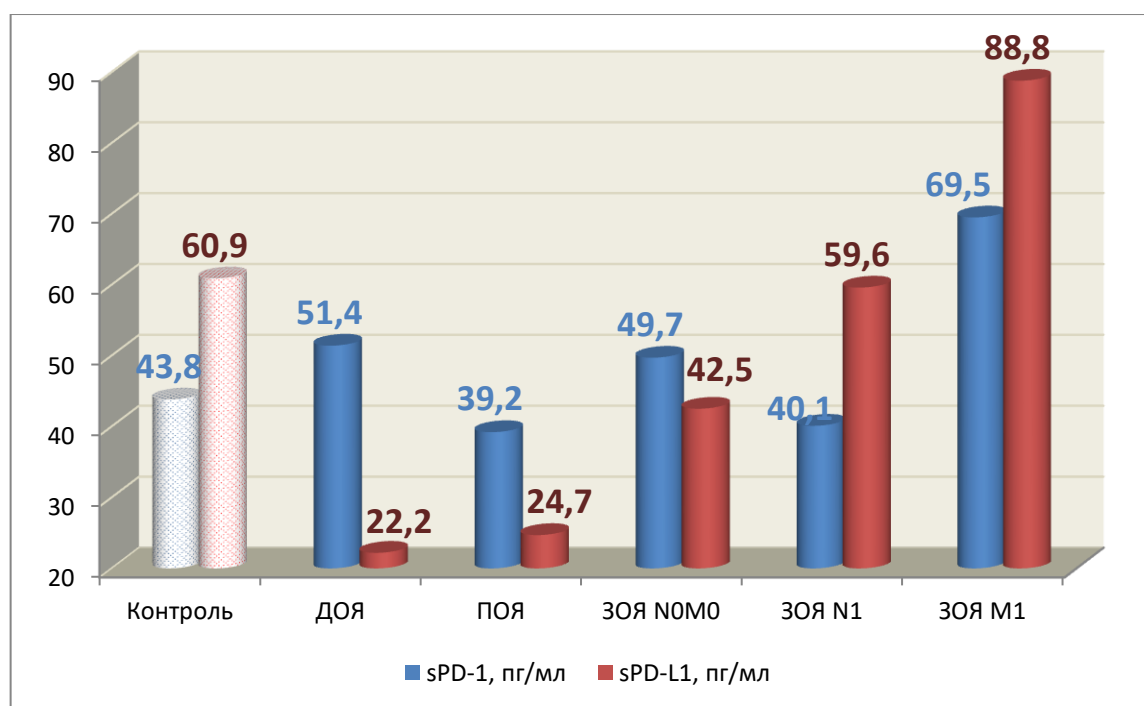


Рисунок 12 – Медианы концентраций sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных злокачественными опухолями яичников в зависимости от наличия метастазов, а также в контроле и больных доброкачественными опухолями яичников и пограничными опухолями яичников

Кроме того, в группах больных раком яичников (N0M0 и N1) различия медиан sPD-1 по сравнению с контролем не были статистически значимы. Установлена статистически значимое различие медиан sPD-L1 в группах больных ДОЯ (22,2 пг/мл) и больных ЗОЯ без метастазов (42,5 пг/мл) ($p=0,016$ медианный тест), как и с группой больных ЗОЯ с наличием только регионарных метастазов в лимфоузлах (59,6 пг/мл, $p=0,038$), а также с наличием метастазов в отдаленных органах (88,8 пг/мл, $p=0,003$). Медиана sPD-L1 в контроле была статистически значимо ниже (60,9 пг/мл) по сравнению с больными ЗОЯ с критерием M1 (88,8 пг/мл, $p=0,017$).

Таким образом, концентрации sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных раком яичников отражают распространенность опухолевого процесса.

В таблице 29 представлены данные по содержанию исследованных маркеров в плазме крови больных ЗОЯ в зависимости от гистологического строения выявленной опухоли. Незначимо бóльшие концентрации как sPD-1, так и sPD-L1 выявлены в группе пациенток с эндометриоидным раком яичников, однако все различия между группами статистически незначимы.

Таблица 29 – Концентрация sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных раком яичников в зависимости от гистологического строения опухоли

| Гистологическое строение опухоли | N | sPD-1, пг/мл | sPD-L1, пг/мл |
|----------------------------------|----|-------------------|-------------------|
| | | Медиана; квартили | Медиана; квартили |
| ¹ Серозный | 74 | 49,9; 37,8-64,7 | 43,3; 22,2-88,8 |
| ² Эндометриоидный | 11 | 53,6; 40,7-71,5 | 53,2; 23,7-64,6 |
| ³ Муцинозный | 6 | 33,2; 32,8-59,1 | 46,9; 16,1-77,1 |
| ⁴ Прочие | 2 | 48,1; 46,1-58,1 | 27,7; 6,7-99,4 |
| P | | >0,05 | >0,05 |

В таблице 30 представлены уровни исследованных маркеров в плазме крови больных ЗОЯ с учетом степени дифференцировки опухоли. Незначимо бóльшие

концентрации как sPD-1, так и sPD-L1 выявлены в группе пациенток с низкой степенью дифференцировки рака яичников, однако все различия между группами статистически незначимы.

Таблица 30 – Концентрация sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных раком яичников в зависимости от степени дифференцировки опухоли

| Степень дифференцировки | N | sPD-1, пг/мл | sPD-L1, пг/мл |
|-------------------------|----|-------------------|-------------------|
| | | Медиана; квартили | Медиана; квартили |
| ¹ Высокая | 15 | 48,3; 32,5-55,3 | 43,3; 24,7-86,4 |
| ² Умеренная | 24 | 42,1; 37,8-60,9 | 40,5; 13,5-64,7 |
| ³ Низкая | 54 | 53,6; 40,1-70,6 | 45,5; 23,5-105 |
| P | | >0,05 | >0,05 |

Примечание: * – абсолютное значение.

В то же время, частота выявления «высоких» значений sPD-1 >65 пг/мл в плазме крови больных ЗОЯ была наименьшей в группе с высокой степенью дифференцировки опухоли и составила 13,3% (2 из 15), незначимо увеличивалась до 16,7% (4 из 24) в группе с умеренной степенью дифференцировки опухоли и значительно увеличивалась до 29,6% (16 из 54) при низкой степени дифференцировки опухоли (p=0,2).

В таблице 31 представлены данные по содержанию исследованных маркеров в плазме крови больных ЗОЯ в зависимости от наличия и отсутствия метастазов в большом сальнике. Достоверно бóльшие концентрации как sPD-1, так и sPD-L1 выявлены в группе пациенток с наличием метастазов в большом сальнике. При этом, медиана и квартили sPD-1 у 14 больных ЗОЯ с метастазами размерами менее 2 см равнялась 53,0 (42,1-68,0) пг/мл, у 41 пациенток с метастазами до 5 см - 50,3 (41,7-72,1) пг/мл и были значительно выше у 3 больных с «панцирным» сальником 70,6 (65,8-89,9) пг/мл. Концентрации sPD-L1 в указанных группах равнялись 25,3 (21,2-42,5) пг/мл; 48,3 (35,1-66,1) пг/мл; 108

(44,4-121) пг/мл соответственно. Частота выявления значений sPD-1 >65 пг/мл значительно повышалась с 8,6% (3 из 30) до 37,9% (22 из 35) в группах больных ЗОЯ без метастазов в большом сальнике и с таковыми (p=0,011).

Таблица 31 – Концентрации sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных раком яичников в зависимости от наличия метастазов в большом сальнике

| Наличие метастазов в большом сальнике | N | sPD-1, пг/мл | sPD-L1, пг/мл |
|---------------------------------------|----|-------------------|-------------------|
| | | Медиана; квартили | Медиана; квартили |
| Не обнаружены | 35 | 47,9; 35,5-56,5 | 23,7; 9,7-53,2 |
| Обнаружены | 58 | 58,0; 42,1-72,1 | 44,4; 27,7-82,0 |
| P | | 0,006; M-W test | 0,005; M-W test |

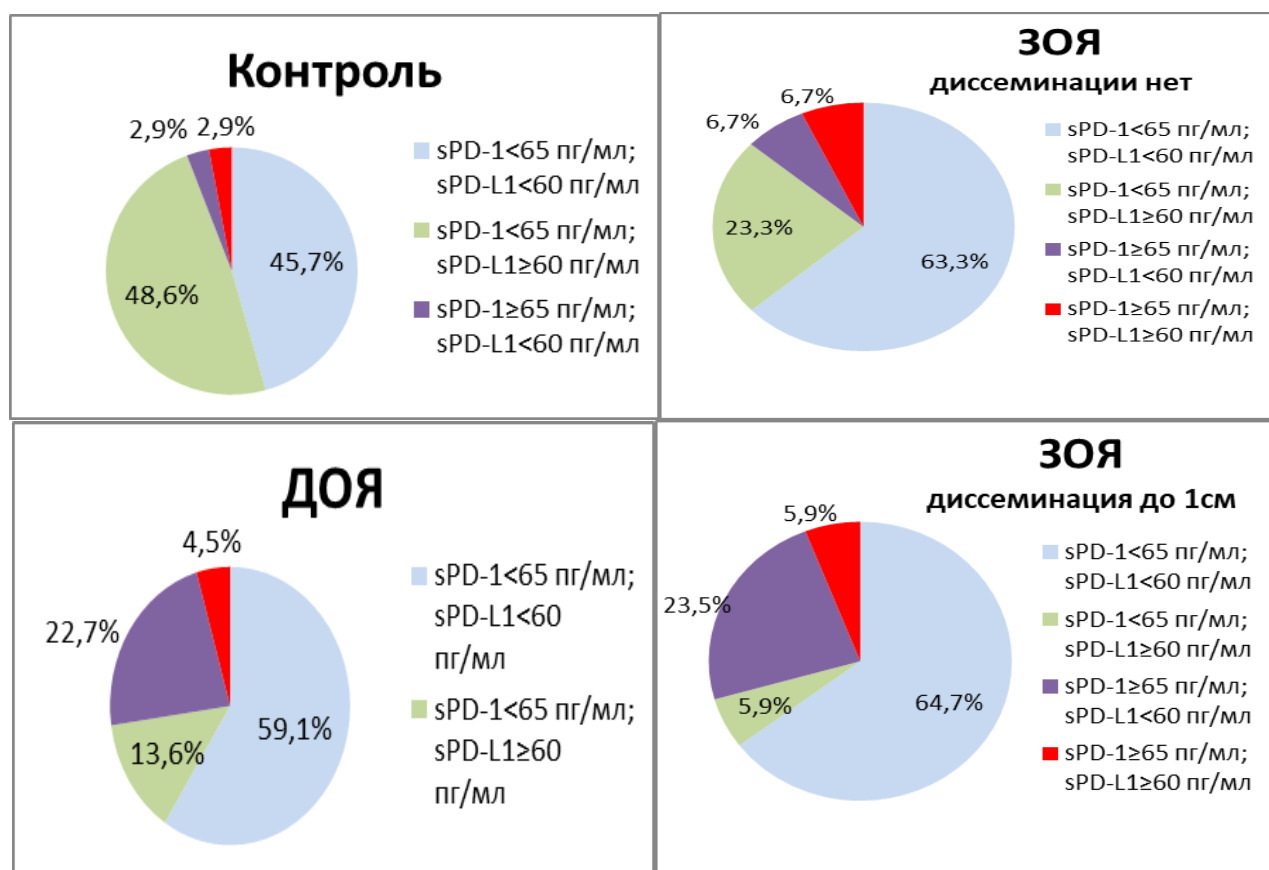
В таблице 32 представлены данные по содержанию показателей в плазме крови больных ЗОЯ в зависимости от наличия и отсутствия диссеминации по брюшине. Заметно бóльшие концентрации как sPD-1, так и sPD-L1 выявлены в группе пациенток с наличием диссеминации опухолевого процесса по брюшине, сильная тенденция к различию медиан.

Таблица 32 – Концентрация sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных раком яичников в зависимости от наличия диссеминации опухоли по брюшине

| Наличие диссеминации опухоли по брюшине | N | sPD-1, пг/мл | sPD-L1, пг/мл |
|---|----|--|--------------------------------------|
| | | Медиана; квартили | Медиана; квартили |
| ⁰ Не обнаружено | 32 | 47,9; 35,5-56,5 | 27,7; 9,7-64,7 |
| ¹ <1 см | 39 | 51,2; 41,7-68,0 | 37,9; 23,7-48,8 |
| ² 1-2 см | 22 | 60,9; 45,8-70,6 | 44,4; 23,5-71,2 |
| P | | 0,054; K-W p _{0vs2} =0,019 | 0,16; K-W p _{0vs2} =0,07 |

Частота выявления «высоких» значений sPD-1 >65 пг/мл в плазме крови больных ЗОЯ была наименьшей в группе с отсутствием диссеминации опухолевого процесса и составила 15,6% (5 из 32), увеличивалась более чем в 2 раза до 30,8% (12 из 39) в группе с просовидной диссеминацией и значительно увеличивалась до 40,9% (9 из 22) при размерах диссеминатов более 1 см в диаметре ($p=0,15$).

На рисунке 13 представлена частота выявления одновременно «высоких» и «низких» значений sPD-1, sPD-L1 в плазме крови больных ЗОЯ в зависимости от выявления и размеров диссеминатов опухоли по брюшине. Заметно повышалась частота одновременно «высоких» значений маркеров при выявлении диссеминатов опухоли с размерами более 1 см до 12,5% при снижении частоты одновременно «низких» значений белков до 37,5%.



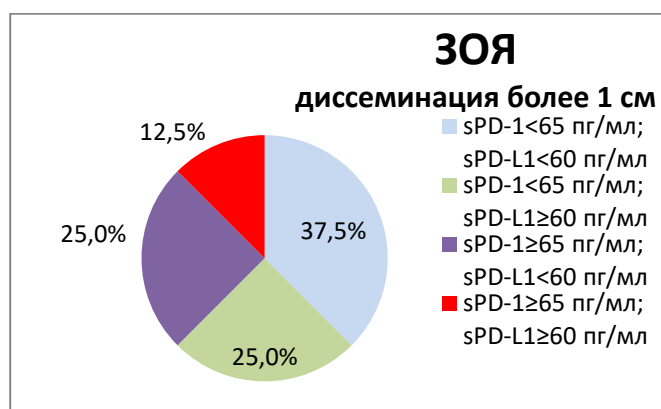


Рисунок 13 – Частота выявления одновременно значений sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных раком яичников в зависимости от наличия и размеров диссеминатов опухоли по брюшине

Если концентрации sPD-1 в плазме крови больных ЗОЯ в группах с наличием и отсутствием асцита практически не различались (медианы 50,3 и 50,1 пг/мл), то сопоставление уровней sPD-L1, напротив, показало высокосущественные различия (медианы 71,9 и 23,7 пг/мл соответственно) ($p < 0,0001$) (Таблица 33).

Таблица 33 – Концентрация sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных раком яичников в зависимости от наличия асцита

| Асцит | N | sPD-1, пг/мл | sPD-L1, пг/мл |
|------------|----|-------------------|-------------------|
| | | Медиана; квартили | Медиана; квартили |
| Не выявлен | 43 | 50,1; 40,1-60,9 | 26,7; 11,9-44,4 |
| Выявлен | 50 | 50,3; 35,8-65,8 | 71,2; 42,3-106 |
| P | | >0,05 | <0,0001; M-W test |

При этом частота выявления «высоких» значений sPD-L1 ≥ 60 пг/мл статистически значимо различалась в 3,1 раза между группами больных раком яичников с наличием (56,0%) и отсутствием асцита (18,6%; $p = 0,0002$).

В таблице 34 представлены концентрации sPD-1, sPD-L1 в плазме крови больных ЗОЯ в зависимости от количества асцитической жидкости. Медиана sPD-1 незначимо повышалась при увеличении объема асцита и была наибольшей при

объемах асцита более 3-5 л. Медиана sPD-L1 была статистически значимо выше также у пациенток с объемом асцита более 3 л (71,2 пг/мл).

Таблица 34 – Концентрация sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных раком яичников в зависимости от количества асцитической жидкости

| Объем асцитической жидкости | N | sPD-1, пг/мл | sPD-L1, пг/мл |
|-----------------------------|----|-------------------|---|
| | | Медиана; Квартили | Медиана; Квартили |
| Не выявлено | 43 | 49,7; 39,5-60,9 | 26,7; 10,8-44,4 |
| ≤ 1 литра | 16 | 49,9; 35,3-70,6 | 48,3; 22,2-71,9 |
| 1,1 – 3,0 литров | 13 | 45,8; 34,2-55,3 | 49,8; 26,2-115 |
| ≥ 3,1 - 5,0 литров | 12 | 62,3; 44,9-89,9 | 71,2; 35,1-102 |
| Более 5 литров | 9 | 64,3; 50,3-71,5 | 60,4; 42,3-66,1 |
| P | | >0,05 | p=0,012; p _{ovs1} =0,08; p _{ovs2} =0,03; p _{ovs3} =0,012; p _{ovs4} =0,045 |

При этом, частота выявления «высоких» значений sPD-L1 ≥ 60 пг/мл существенно повышалась при объемах асцитической жидкости от 3 л и более (Рисунок 14).

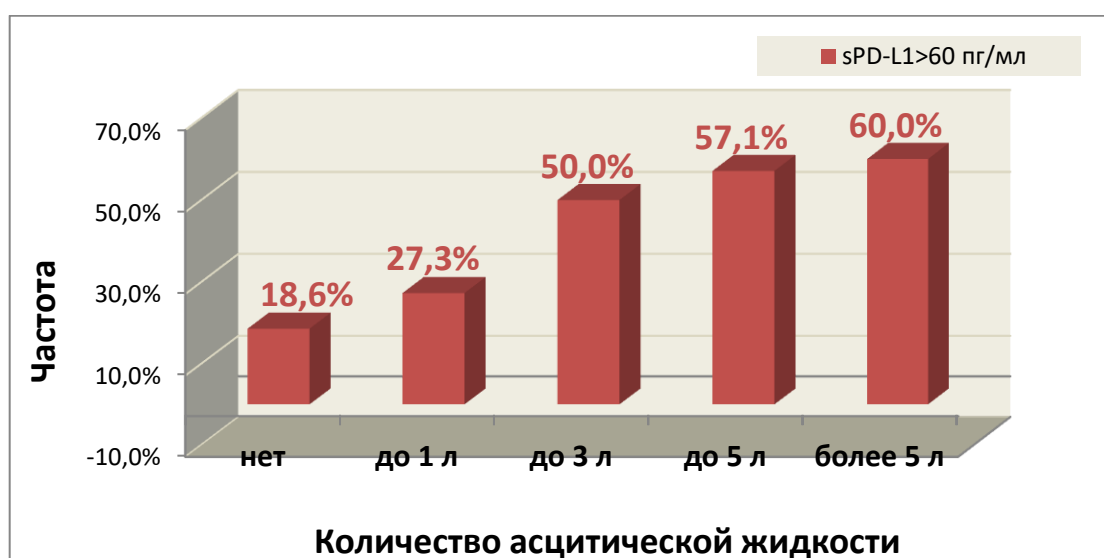


Рисунок 14 – Частота выявления sPD-L1 ≥ 60 пг/мл в плазме крови больных ЗОЯ в зависимости от количества асцитической жидкости

В группе больных ЗОЯ с объемом асцита более 5 л выявлена наибольшая частота одновременно «высоких» значений sPD-1 ≥ 65 пг/мл и sPD L1 ≥ 60 пг/мл (25%) при одновременно наименьшей частоте «низких» значений белков (25%) (Рисунок 15).

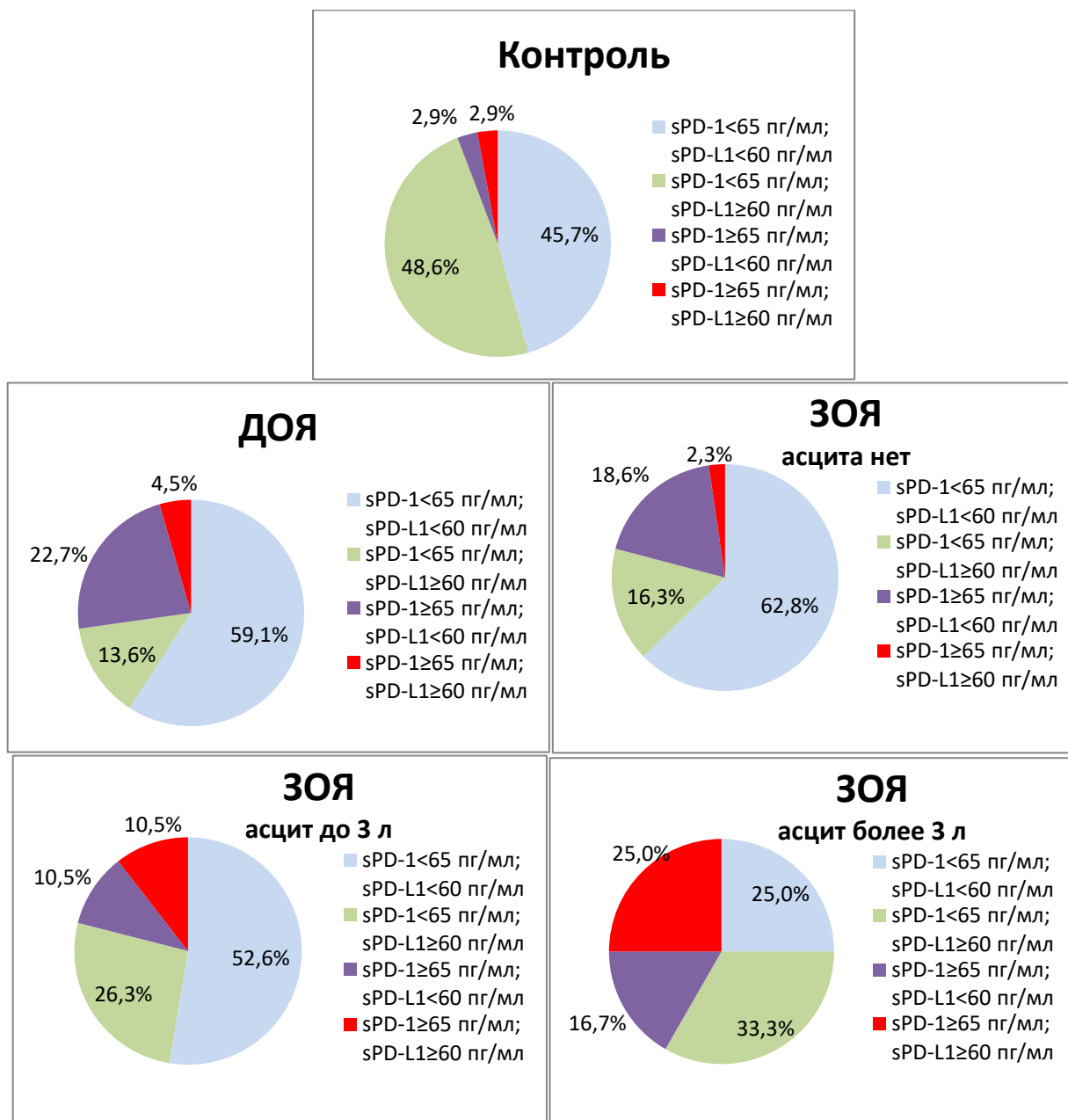


Рисунок 15 – Частота выявления одновременно значений sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных раком яичников в зависимости от наличия и объема асцита

Аналогичные результаты получены и при изучении такого клинического фактора, как выявление опухолевых клеток в смывах из брюшной полости (Таблица 35). Так, медиана sPD-1 в плазме крови не отражала наличие

опухолевых клеток в смывах из брюшной полости, тогда как медиана sPD-L1 была статистически значимо выше в группе больных ЗОЯ с выявленными опухолевыми клетками (82,0 пг/мл), чем у пациенток с отсутствием таковых (42,0 пг/мл; $p=0,04$).

Таблица 35 – Концентрации sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных раком яичников в зависимости от наличия опухолевых клеток в смывах из брюшной полости

| Опухолевые клетки в смывах из брюшной полости | N | sPD-1, пг/мл | sPD-L1, пг/мл |
|---|----|-------------------|-------------------|
| | | Медиана; квартили | Медиана; квартили |
| Не выявлены | 11 | 51,2; 40,7-60,9 | 42,0; 912,4-77,1 |
| Выявлены | 24 | 48,3; 32,5-58,8 | 82,0; 23,7-111 |
| P | | >0,05 | 0,04; M-W test |

В то же время частота выявления «высоких» значений sPD-L1 ≥ 60 пг/мл в указанных группах значимо не различалась (62,5% и 45,5% соответственно, $p=0,3$).

Концентрация sPD-1 в плазме крови больных ЗОЯ не была связана корреляционной зависимостью с уровнями опухолевого маркера СА-125 ($r_s=0,03$; $p>0,05$), как и с уровнями HE-4 ($r_s=0,08$; $p>0,05$). Концентрации sPD-L1 были связаны прямой корреляционной зависимостью как у уровнями СА-125 ($r_s=0,34$; $p<0,05$), так и с уровнями HE-4 ($r_s=0,49$; $p<0,05$).

Таким образом, значимое повышение концентрации sPD-1 наблюдали в плазме крови больных раком яичников при диссеминации опухолевого процесса по брюшине (диссеминаты размером 1,0 см) и при увеличении распространенности заболевания (критерий T3c), незначимое - при отдаленных метастазах и метастазах в большом сальнике.

Частота выявления «высоких» значений sPD-1 ≥ 65 пг/мл значимо повышалась при выявлении отдаленных метастазов и при метастазах в большом

сальнике.

Повышение концентрации sPD-L1 статистически значимо отражало стадию заболевания, размеры первичной опухоли, наличие метастазов в большом сальнике, наличие опухолевых клеток в смывах из брюшной полости. Незначимое увеличение концентрации этого маркера в плазме крови больных раком яичников наблюдали при диссеминации опухолевого процесса по брюшине. Частота выявления концентраций sPD-L1 ≥ 60 пг/мл была статистически значимо выше в группе больных ЗОЯ с наличием асцита, а также при объемах асцитической жидкости от 3 л и более.

Многофакторный анализ показал, что в наибольшей степени концентрация sPD-L1 в плазме крови больных ЗОЯ связана с размерами первичной опухоли ($p=0,01$), наличием асцита ($p=0,012$) и отдаленных метастазов ($p=0,042$). В меньшей степени концентрации sPD-L1 в плазме крови больных раком яичников связаны с выявлением опухолевых клеток в смывах из брюшной полости ($p=0,42$), с наличием метастазов опухоли в большом сальнике ($p=0,8$) и при диссеминации опухоли по брюшине ($p=0,3$). Так превышение медиан sPD-L1 в указанных группах составило 2,9; 2,7; 2,1; 2,0; 1,9 и 1,6 раза, соответственно.

Такие важные клинические признаки рака яичников как степень дифференцировки опухоли и гистологический вариант строения опухоли не были статистически значимо связаны с концентрациями sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных.

ГЛАВА 4. УРОВНИ МЕТИЛИРОВАНИЯ И ЭКСПРЕССИИ ГРУППЫ ГЕНОВ микроРНК В ТКАНИ ОПУХОЛИ И МЕТАСТАЗОВ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ

4.1. Уровни метилирования генов микроРНК в ткани опухоли больных раком яичников

Уровни метилирования 14 генов микроРНК (*MIR-124a-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125b-1*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-132*, *MIR-137*, *MIR-203a*, *MIR-34b*, *MIR-34c*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*) были определены в ткани опухоли 26 больных РЯ, в 19 образцах метастазов и в 15 образцах неизменной ткани яичников этих пациенток. В связи с небольшим количеством наблюдений в качестве центральной характеристики показателей выбрана медиана, в качестве меры разброса – квартили, для сравнения медиан использованы непараметрические критерии, корреляционные зависимости также оценивали непараметрическими критериями. Пределы колебания показателей в неизменной ткани яичников и ткани метастаза совпали с 95% CI (доверительный интервал, малое число наблюдений).

В таблице 36 представлены статистические характеристики уровня метилирования 14 генов микроРНК в 2-х группах: в ткани опухоли и метастазов.

Таблица 36 – Уровни метилирования (в %) 14 генов микроРНК в ткани опухоли и метастазов больных раком яичников

| микроРНК | Ткань опухоли яичников (n=26) | | Ткань метастазов (n=19) | |
|-------------------|-------------------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|
| | Медиана; квартили | Пределы; 95% CI | Медиана; квартили | Пределы; 95% CI |
| <i>MIR-124a-2</i> | 45,2; 29,0-94,4 | 0,2-98,1; 2,0-97,5 | 44,3; 20,4-84,8 | 11,7-98,8 |
| <i>MIR-124-3</i> | 17,9; 12,8-32,7 | 3,8-68,2; 8,5-56,8 | 21,9; 9,4-37,2 | 1,7-89,1 |
| <i>MIR-125b-1</i> | 38,6; 12,2-81,1 | 4,0-99,3; 4,8-96,4 | 44,4; 13,0-67,5 | 8,0-91,3 |

| | | | | |
|------------------|-----------------|--------------------|-----------------|----------|
| <i>MIR-127</i> | 36,9; 20,3-64,8 | 0,4-93,3; 1,9-88,4 | 47,3; 26,7-73,4 | 8,0-92,4 |
| <i>MIR-129-2</i> | 27,0; 15,2-51,2 | 2,1-80,6; 3,1-62,7 | 31,4; 21,5-56,1 | 2,3-83,8 |
| <i>MIR-132</i> | 22,0; 4,9-49,3 | 0,6-98,5; 0,8-91,5 | 30,0; 4,6-69,1 | 0,3-99,8 |
| <i>MIR-137</i> | 17,6; 10,7-32,3 | 1,0-91,0; 1,3-64,4 | 23,6; 15,2-47,8 | 0,4-96,8 |
| <i>MIR-203a</i> | 6,8; 1,9-17,6 | 0,7-67,4; 0,8-37,6 | 23,3; 1,6-65,7 | 0,1-96,1 |
| <i>MIR-34b</i> | 12,5; 2,0-18,5 | 0,1-85,3; 0,2-50,2 | 15,3; 11,1-54,0 | 0,1-93,1 |
| <i>MIR-34c</i> | 12,3; 2,1-20,1 | 1,2-85,3; 1,3-50,3 | 15,2; 11,1-52,2 | 0,1-92,1 |
| <i>MIR-375</i> | 15,9; 10,3-23,3 | 1,0-43,3; 1,8-35,9 | 27,0; 8,6-45,1 | 0,4-69,3 |
| <i>MIR-9-1</i> | 9,2; 7,6-20,8 | 0,1-90,8; 0,5-75,6 | 11,9; 8,9-44,9 | 1,4-69,3 |
| <i>MIR-9-3</i> | 20,6; 8,6-45,1 | 0,4-90,7; 2,3-59,6 | 25,8; 9,3-33,4 | 1,8-91,0 |
| <i>MIR-339</i> | 11,8; 7,5-32,8 | 3,8-94,4; 3,9-78,3 | 27,8; 12,8-51,0 | 5,8-95,6 |

Наибольший уровень метилирования в опухоли больных РЯ в сравнении с гистологически неизменной тканью яичников отмечен у 3-х генов микроРНК *MIR-124a-2*, *MIR-125b-1*, *MIR-127*, медианы метилирования составили в среднем: 45,2%, 38,6% и 36,9% (Таблица 36). Этот результат указывает на ассоциацию гиперметилирования этих генов микроРНК с процессом возникновения/развития РЯ на начальных стадиях. Данные гены могут иметь диагностический потенциал.

При сравнении медиан метилирования генов микроРНК в ткани опухоли и метастазов у последних отмечено значимое повышение уровня метилирования гена микроРНК *MIR-203a* (23,3% против 6,8%; $p=0,027$) (Рисунок 16). Кроме того, медиана метилирования гена микроРНК *MIR-375* в метастазах также была заметно выше таковой, чем в опухоли (27,0% против 15,9%; $p=0,08$ сильная тенденция к различию). Следует отметить, что медиана метилирования гена микроРНК *MIR-339* также была заметно выше в метастазах по сравнению с опухолью (27,8% против 11,8%; $p=0,15$).

Таким образом, у больных РЯ выявлено повышение уровня метилирования 11 из 14 генов микроРНК в первичной опухоли и наблюдали дальнейшее

повышение уровня метилирования ряда генов микроРНК в метастазах РЯ.

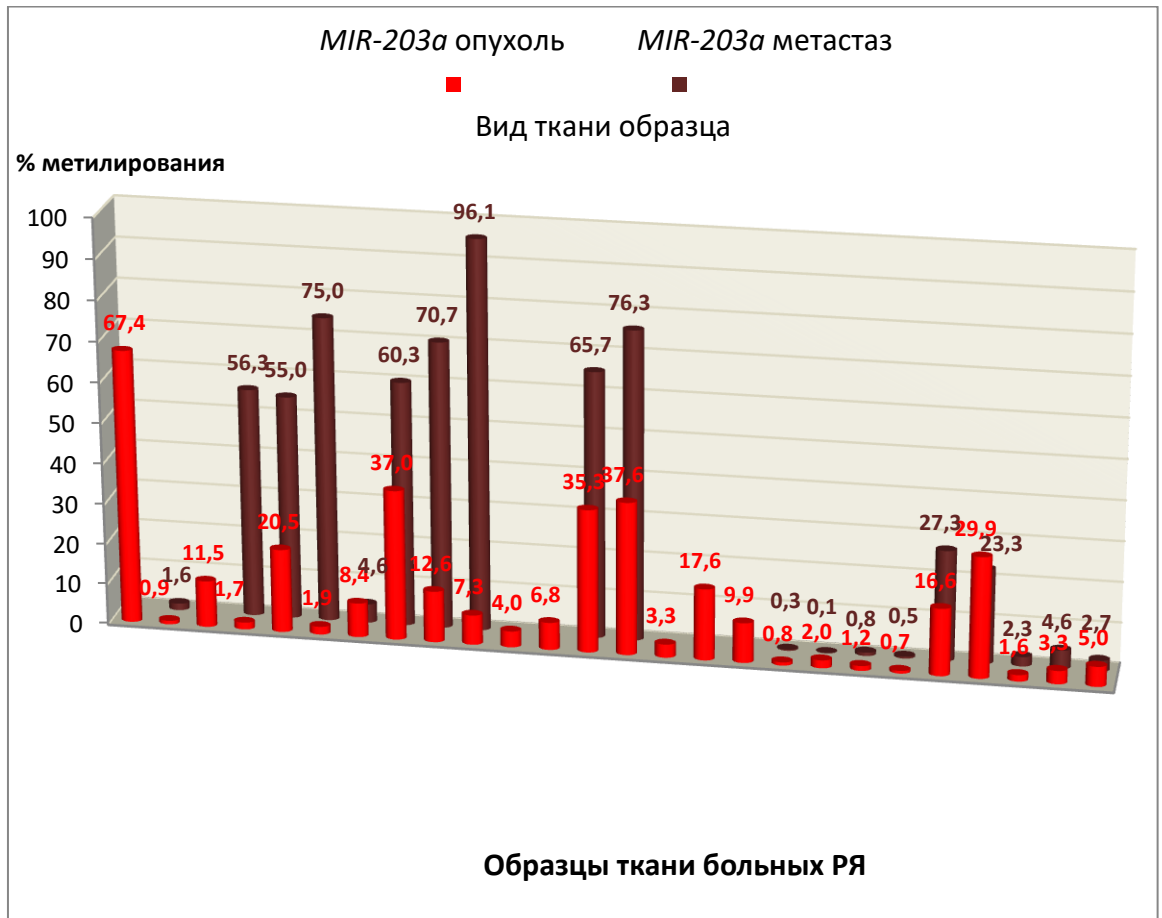


Рисунок 16 – Уровень метилирования (%) гена микроРНК *MIR-203a* в ткани опухоли и метастазов больных раком яичников

Следует отметить, что наибольший коэффициент конкордации (согласованности характера метилирования), равный 0,78, получен для генов *MIR-34c*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*. Также высокий коэффициент конкордации, равный 0,75, получен для генов *MIR-125b-1*, *MIR-34b*, *MIR-339*. Следовательно, у большинства больных РЯ уровни метилирования исследованных генов микроРНК были высокими и в опухолях, и в метастазах.

Коэффициент конкордации (согласованности) уровня метилирования в 2-х видах образцов ткани (опухоль, метастаз) показателей *MIR-124-3*, *MIR-132*, *MIR-203a*, *MIR-375* был очень низким (для *MIR-124-3* равнялся 0,26; для *MIR-132* – 0,05; для *MIR-203a* – 0,03; для *MIR-375* – 0,11). Это указывает на то, что уровни

метилирования этих генов микроРНК в ткани опухоли и метастазов относительно друг друга у разных больных РЯ имели разный характер (несогласованы).

У большинства больных РЯ выявлено многократное превышение уровня метилирования гена микроРНК *MIR-125b-1* в ткани опухоли, тогда как метилирование этого гена микроРНК в метастазах могло, как превышать таковой показатель в опухоли яичников, так и быть заметно меньше (Рисунок 17).

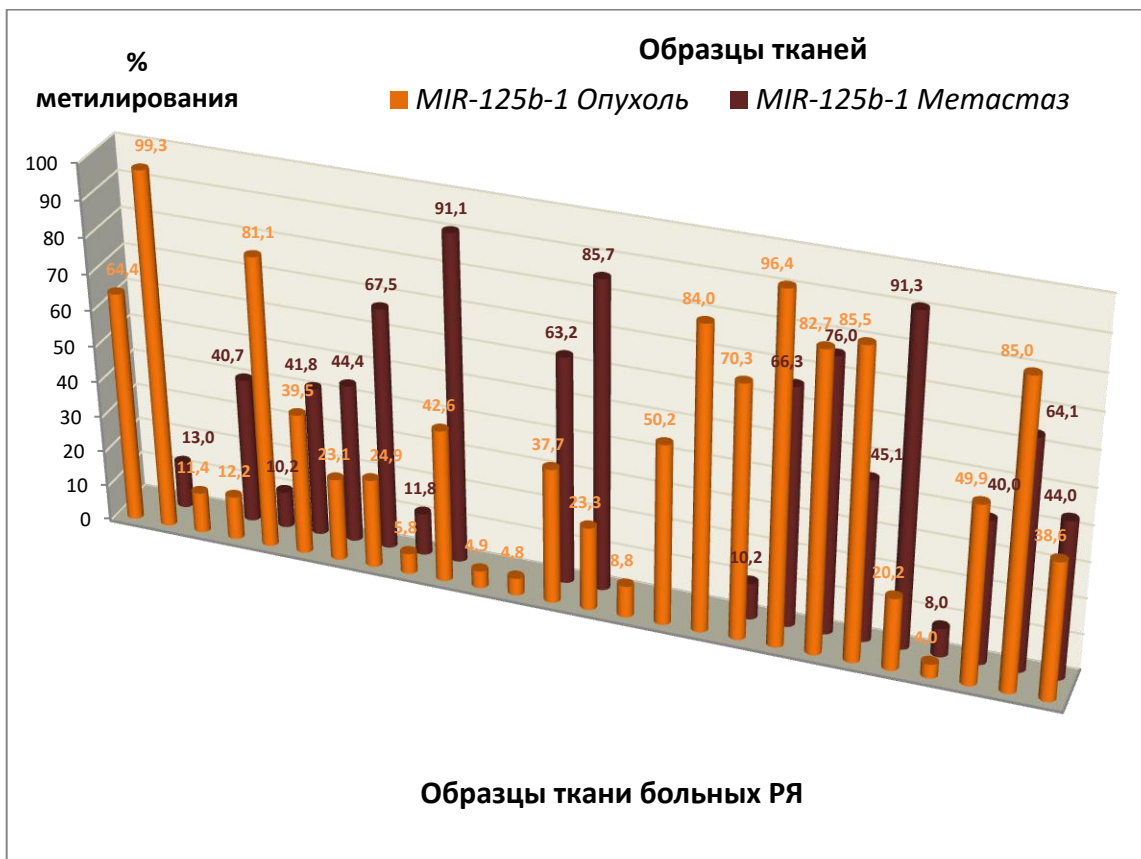


Рисунок 17 – Уровень метилирования (%) гена *MIR-125b-1* в опухолях и метастазах больных раком яичников

Дополнительно рассчитали соотношение уровней метилирования генов микроРНК в тканях метастаза/тканях опухоли той же больной, а также частоту превышения. Как следует из данных таблицы 37, превышение метилирования в ткани метастаза над таковым в первичной опухоли наиболее часто выявляли для генов микроРНК *MIR-339* (в 68,4% наблюдений) и *MIR-203a* (в 63,2% наблюдений). По гену *MIR-203a* получена также наибольшая медиана величины

этого превышения (1,6). С другой стороны, ген микроРНК *MIR-339* показал наиболее стабильные закономерности метилирования в опухоли и в ткани метастаза для большинства больных ЗОЯ. Можно предполагать наибольшую вовлеченность генов микроРНК *MIR-203a* и *MIR-339* в процесс образования и колонизации метастазов больных РЯ.

Таблица 37 – Соотношения показателей метилирования генов микроРНК в ткани метастазов/ткани опухолей больных раком яичников

| микроРНК | Метастаз/Опухоль (n=19) | |
|-------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | Частота > или <1; медиана | Квартили; пределы колебания |
| <i>MIR-124a-2</i> | 47,4%; 0,9 | 0,4-1,9; 0,1-3,1 |
| <i>MIR-124-3</i> | 31,6%; 0,9 | 0,6-2,2; 0,06-3,8 |
| <i>MIR-125b-1</i> | 57,9%; 1,1 | 0,7-2,1; 0,1-4,5 |
| <i>MIR-127</i> | 57,9%; 1,4 | 0,5-1,9; 0,3-8,1 |
| <i>MIR-129-2</i> | 57,9%; 1,1 | 0,6-1,9; 0,5-3,1 |
| <i>MIR-132</i> | 52,6%; 1,1 | 0,5-2,5; 0,3-15,4 |
| <i>MIR-137</i> | 63,2%; 1,3 | 0,5-2,1; 0,3-4,3 |
| <i>MIR-203a</i> | 63,2%; 1,6 | 0,7-2,7; 0,05-38,8 |
| <i>MIR-34b</i> | 57,9%; 1,3 | 0,8-2,8; 0,06-4,9 |
| <i>MIR-34c</i> | 52,6%; 1,1 | 0,8-2,8; 0,078-4,9 |
| <i>MIR-375</i> | 57,9%; 1,4 | 0,4-3,2; 0,04-7,3 |
| <i>MIR-9-1</i> | 42,1%; 0,9 | 0,5-2,4; 0,2-8,2 |
| <i>MIR-9-3</i> | 42,1%; 0,5 | 0,4-2,6; 0,09-25,8 |
| <i>MIR-339</i> | 68,4%; 1,3 | 0,5-3,0; 0,08-11,5 |

Оценили корреляционные зависимости между уровнями генов метилирования микроРНК в ткани опухоли и ткани метастазов (Таблица 38).

Таблица 38 – Корреляционные зависимости между уровнями метилирования микроРНК в ткани опухоли и метастазов больных раком яичников

| микроРНК | Опухоль – Метастаз |
|-------------------|--------------------------|
| <i>MIR-124a-2</i> | $r_s = -0,12$ |
| <i>MIR-124-3</i> | $r_s = 0,42; p = 0,07$ |
| <i>MIR-125b-1</i> | $r_s = 0,07$ |
| <i>MIR-127</i> | $r_s = -0,22$ |
| <i>MIR-129-2</i> | $r_s = 0,58; p = 0,009$ |
| <i>MIR-132</i> | $r_s = 0,68; p = 0,001$ |
| <i>MIR-137</i> | $r_s = 0,19$ |
| <i>MIR-203a</i> | $r_s = 0,67; p = 0,0016$ |
| <i>MIR-34b</i> | $r_s = 0,77; p = 0,0001$ |
| <i>MIR-34c</i> | $r_s = 0,78; p < 0,0001$ |
| <i>MIR-375</i> | $r_s = 0,26$ |
| <i>MIR-9-1</i> | $r_s = 0,35; p = 0,14$ |
| <i>MIR-9-3</i> | $r_s = 0,21$ |
| <i>MIR-339</i> | $r_s = 0,03$ |

Установлена тесная линейная корреляционная зависимость между уровнями метилирования генов микроРНК *MIR-34b*, *MIR-34c*, *MIR-132*; *MIR-129-2* в опухоли яичников и в ткани метастаза.

Проведен анализ корреляционной ассоциации между уровнями метилирования для всех возможных попарных сочетаний генов микроРНК в опухоли больных РЯ. В таблице 39 представлены только значимые зависимости.

Таблица 39 – Корреляционные зависимости между уровнями метилирования генов микроРНК в ткани опухоли больных раком яичников

| Корреляция микроРНК в опухоли | r_s | P |
|--------------------------------------|-------|---------|
| <i>MIR-124a-2</i> – <i>MIR-127</i> | 0,71 | <0,0001 |
| <i>MIR-124a-2</i> – <i>MIR-129-2</i> | 0,52 | 0,007 |

| | | |
|-----------------------------|------|---------|
| <i>MIR-124a-2 – MIR-34b</i> | 0,62 | 0,0007 |
| <i>MIR-124a-2 – MIR-34c</i> | 0,48 | 0,012 |
| <i>MIR-124a-2 – MIR-9-1</i> | 0,52 | 0,006 |
| <i>MIR-124a-2 – MIR-9-3</i> | 0,45 | 0,02 |
| <i>MIR-124a-2 – MIR-339</i> | 0,42 | 0,03 |
| <i>MIR-124-3 – MIR-137</i> | 0,51 | 0,008 |
| <i>MIR-125b-1 – MIR-127</i> | 0,39 | 0,049 |
| <i>MIR-125b-1 – MIR-9-1</i> | 0,42 | 0,03 |
| <i>MIR-125b-1 – MIR-9-3</i> | 0,55 | 0,004 |
| <i>MIR-125b-1 – MIR-339</i> | 0,64 | 0,0004 |
| <i>MIR-127 – MIR-129-2</i> | 0,57 | 0,002 |
| <i>MIR-127 – MIR-34b</i> | 0,44 | 0,02 |
| <i>MIR-127 – MIR-34c</i> | 0,40 | 0,045 |
| <i>MIR-127 – MIR-9-1</i> | 0,42 | 0,03 |
| <i>MIR-127 – MIR-339</i> | 0,58 | 0,002 |
| <i>MIR-129-2 – MIR-132</i> | 0,72 | <0,0001 |
| <i>MIR-129-2 – MIR-34b</i> | 0,45 | 0,02 |
| <i>MIR-137 – MIR-203a</i> | 0,51 | 0,008 |
| <i>MIR-137 – MIR-34c</i> | 0,41 | 0,037 |
| <i>MIR-34b – MIR-34c</i> | 0,93 | <0,0001 |
| <i>MIR-34b – MIR-375</i> | 0,43 | 0,027 |
| <i>MIR-34b – MIR-9-1</i> | 0,64 | 0,0004 |
| <i>MIR-34c – MIR-375</i> | 0,47 | 0,015 |
| <i>MIR-34c – MIR-9-1</i> | 0,54 | 0,004 |
| <i>MIR-375 – MIR-9-1</i> | 0,50 | 0,009 |
| <i>MIR-9-1 – MIR-339</i> | 0,59 | 0,0016 |
| <i>MIR-9-3 – MIR-339</i> | 0,43 | 0,029 |

Как следует из данных таблицы 39, значимые прямые корреляции установлены для 29 пар микроРНК. Наиболее высоко значимые линейные зависимости в ткани первичной опухоли больных РЯ установлены между уровнями метилирования генов микроРНК *MIR-34b* и *MIR-34c* ($r_s=0,93$; $p<0,0001$).

Установлена также статистически высокозначимая прямая корреляционная зависимость между уровнями метилирования генов микроРНК *MIR-129-2* и *MIR-132* ($r_s=0,72$; $p<0,0001$) в опухоли, то есть у большей части больных ЗОЯ высоким значениям метилирования одного из выше указанных генов микроРНК чаще соответствовали также высокие значения другого гена микроРНК и наоборот.

Также довольно тесная статистически высокозначимая линейная зависимость в опухоли больных РЯ выявлена между уровнями метилирования генов микроРНК *MIR-124a-2* и *MIR-127* ($r_s=0,71$; $p<0,0001$).

Итак, при анализе опухолей наиболее высоко значимые корреляции выявлены для следующих пар генов: *MIR-34b* и *MIR-34c*; *MIR-129-2* и *MIR-132*; *MIR-124a-2* и *MIR-127* ($r_s>0,7$; $p<0,0001$).

В ткани метастазов больных РЯ также выявлены тесные корреляционные зависимости между уровнями метилирования генов микроРНК *MIR-34b* и *MIR-34c* ($r_s=0,99$; $p<0,0001$). В метастазах тесные прямые зависимости обнаружены также между генами микроРНК: *MIR-9-1* и *MIR-34b* ($r_s=0,88$; $p<0,0001$), между *MIR-34c* и *MIR-9-1* ($r_s=0,9$; $p<0,0001$) и между *MIR-129-2* и *MIR-132* ($r_s=0,81$; $p<0,0001$) (Таблица 40).

Таблица 40 – Корреляционные зависимости между уровнями метилирования генов микроРНК в ткани метастазов больных раком яичников

| микроРНК в ткани метастазов | r_s | P |
|--------------------------------|-------|---------|
| <i>MIR-124a-2 – MIR-125b-1</i> | 0,53 | 0,02 |
| <i>MIR-124-3 – MIR-339</i> | 0,58 | 0,01 |
| <i>MIR-127 – MIR-129-2</i> | 0,47 | 0,04 |
| <i>MIR-129-2 – MIR-132</i> | 0,81 | <0,0001 |

Продолжение таблицы 40

| | | |
|-----------------------------|-------|---------|
| <i>MIR-129-2 – MIR-137</i> | 0,53 | 0,02 |
| <i>MIR-129-2 – MIR-203a</i> | 0,64 | 0,003 |
| <i>MIR-132 – MIR-203a</i> | 0,64 | 0,003 |
| <i>MIR-203a – MIR-34b</i> | 0,56 | 0,012 |
| <i>MIR-203a – MIR-34c</i> | 0,59 | 0,008 |
| <i>MIR-203a – MIR-9-1</i> | 0,56 | 0,014 |
| <i>MIR-34b – MIR-34c</i> | 0,99 | <0,0001 |
| <i>MIR-34b – MIR-9-1</i> | 0,88 | <0,0001 |
| <i>MIR-34c – MIR-9-1</i> | 0,9 | <0,0001 |
| <i>MIR-375 – MIR-9-3</i> | -0,46 | 0,04 |

Эти результаты указывают на согласованность между процессами метилирования в парах генов микроРНК как в опухолях, так и в метастазах. Причем, в опухолях отмечены значимые корреляции для 29 пар генов микроРНК, а в метастазах – для 14 пар микроРНК. Высоко значимые корреляции в опухолях выявлены для трех пар генов микроРНК *MIR-124a-2* и *MIR-127*; *MIR-129-2* и *MIR-34b* и *MIR-34c* ($r_s > 0,7$; $p < 0,0001$), а в метастазах – для четырех пар генов микроРНК *MIR-34b* и *MIR-34c*; *MIR-34b* и *MIR-9-1*; *MIR-34c* и *MIR-9-1*; *MIR-129-2* и *MIR-132* ($r_s > 0,8$; $p < 0,0001$). Высоко значимые корреляционные зависимости между генами микроРНК *MIR-129-2* и *MIR-132* ($r_s = 0,72-0,81$; $p < 0,0001$) установлены и в метастазах, и в опухолях яичников.

Для выявления структуры взаимосвязей уровней метилирования генов микроРНК в ткани опухоли и метастазов больных РЯ провели факторный анализ.

В ткани опухоли 1-й общий фактор составили гены метилирования микроРНК *MIR-137*, *MIR-34b*, *MIR-34c*, *MIR-9-1* (36,8% всей наблюдаемой изменчивости); 2-й общий фактор составили гены микроРНК *MIR-125b-1*, *MIR-9-1*, *MIR-339* (15,1% всей наблюдаемой изменчивости); 3-й общий фактор составили гены микроРНК *MIR-124a-2*, *MIR-129-2*, *MIR-132* (12,2% всей наблюдаемой

изменчивости). В ткани метастазов РЯ в 1-й общий фактор вошли гены микроРНК *MIR-34b*, *MIR-34c*, *MIR-9-1*, (32,5% всей наблюдаемой изменчивости); 2-й общий фактор составили гены микроРНК *MIR-125b-1* и *MIR-129-2* (фактор объяснял 15,6% всей наблюдаемой изменчивости); 3-й общий фактор составили гены микроРНК *MIR-375* и *MIR-9-3* (с 14,5% наблюдаемой изменчивости).

Таким образом, микроРНК *MIR-34b*, *MIR-34c*, *MIR-9-1*, составившие 1-й фактор, в значительной степени дублируют друг друга независимо от типа исследованной ткани больных РЯ. Эти данные показывают возможное участие таких микроРНК в общих биологических процессах, что требует дальнейших исследований, в частности, анализ генов-мишеней.

Не установлено значимой связи между возрастом больных РЯ и уровнями метилирования всех 14 изученных генов микроРНК, определенных в опухоли, а также в тканях метастазов.

В опухоли больных РЯ не установлено значимой корреляционной зависимости между уровнем опухоль-ассоциированного маркера СА-125 в сыворотке крови и уровнем метилирования всех 14 генов микроРНК. Однако, следует отметить наличие слабой прямой зависимости между сывороточными уровнями СА-125 и геном *MIR-124a-2* ($r_s=0,33$; $p=0,09$), а также с геном *MIR-125b-1* ($r_s=0,37$; $p=0,06$) и слабой обратной зависимости с геном *MIR-203a* ($r_s= -0,31$; $p=0,1$).

У больных РЯ выявлена статистически значимая зависимость между сывороточными уровнями маркера СА-125 и метилированием гена микроРНК *MIR-375* в ткани метастазов ($r_s=0,49$; $p=0,033$).

4.2. Связь метилирования маркеров микроРНК в тканях больных раком яичников с клиническими факторами заболевания

Из 26 исследуемых образцов опухоли 17 больных РЯ были в IIIc, 5 – в Ic, 1 – в IIb, 2 – в IIIa, 1 – в IIIb стадии. В связи с малым количеством образцов ткани

больных РЯ начальных стадий, были выделены 3 группы: 1) группа – Ic стадии (n=5); 2) группа – IIb-IIIa,b стадии (n=4); 3) группа – IIIc стадия (n=17).

Оценили корреляционные зависимости между уровнем метилирования 14 генов микроРНК в ткани опухоли и стадией РЯ (Таблица 41).

Таблица 41 – Корреляционные зависимости между уровнем метилирования генов микроРНК в ткани опухоли и стадией рака яичников

| Стадия & микроРНК | Ткань опухоли яичников |
|-------------------|------------------------|
| <i>MIR-124a-2</i> | $r_s=0,5; p=0,009$ |
| <i>MIR-124-3</i> | $r_s=-0,05$ |
| <i>MIR-125b-1</i> | $r_s=0,44; p=0,026$ |
| <i>MIR-127</i> | $r_s=0,23$ |
| <i>MIR-129-2</i> | $r_s=0,45; p=0,022$ |
| <i>MIR-132</i> | $r_s=0,09$ |
| <i>MIR-137</i> | $r_s=0,23$ |
| <i>MIR-203a</i> | $r_s=-0,18$ |
| <i>MIR-34b</i> | $r_s=0,48; p=0,013$ |
| <i>MIR-34c</i> | $r_s=0,34$ |
| <i>MIR-375</i> | $r_s=0,43; p=0,027$ |
| <i>MIR-9-1</i> | $r_s=0,49; p=0,01$ |
| <i>MIR-9-3</i> | $r_s=0,5; p=0,009$ |
| <i>MIR-339</i> | $r_s=0,44; p=0,025$ |

Как следует из данных таблицы 41 уровни метилирования 8-и генов микроРНК (*MIR-124a-2*, *MIR-125b-1*, *MIR-129-2*, *MIR-34b*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*) статистически значимо были связаны со стадией РЯ прямой корреляционной зависимостью средней степени тесноты связанности ($r_s=0,44-0,5$; $p=0,01-0,026$). Следовательно, уровни метилирования генов микроРНК повышались по мере распространенности опухолевого процесса.

Рассчитали статистические характеристики метилирования 14 генов микроРНК в ткани опухоли больных РЯ в сформированных группах с учетом стадии заболевания (Таблица 42).

Таблица 42 – Уровни метилирования генов микроРНК в ткани опухоли больных раком яичников различных стадий

| микроРНК в ткани опухоли | Стадия заболевания | | | P |
|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | ¹ Ic (n=5) | ² IIa, IIb, IIIa (n=4) | ³ IIIc (n=17) | |
| | Метилирование генов микроРНК | | | |
| | Медиана; квартили | Медиана; квартили | Медиана; квартили | |
| <i>MIR-124a-2</i> | 5,0; 2,0-5,2 | 38,7; 29,5-95,6 | 56,4; 36,6-94,4 | 0,004 |
| <i>MIR-124-3</i> | 13,1; 7,2-17,9 | 27,3; 29,5-31,0 | 20,2; 12,8-32,7 | 0,22 |
| <i>MIR-125b-1</i> | 8,8; 4,9-11,4 | 37,7; 23,3-38,6 | 50,2; 23,1-84,0 | 0,054; _{1vs3} 0,02 |
| <i>MIR-127</i> | 4,8; 3,8-7,9 | 67,3; 36,4-80,2 | 37,0; 29,1-61,9 | 0,014 |
| <i>MIR-129-2</i> | 5,6; 3,1-5,7 | 26,7; 20,3-31,0 | 36,0; 21,4-51,5 | 0,036 |
| <i>MIR-132</i> | 13,6; 6,3-30,4 | 16,6; 6,5-36,3 | 26,9; 3,7-50,0 | 0,6 |
| <i>MIR-137</i> | 7,7; 2,7-9,4 | 15,7; 14,3-43,6 | 20,9; 13,5-31,9 | 0,15 |
| <i>MIR-203a</i> | 6,7; 4,0-7,3 | 20,5; 5,0-35,3 | 3,3; 1,6-16,6 | 0,16 |
| <i>MIR-34b</i> | 0,2; 0,1-1,5 | 7,7; 0,7-18,1 | 13,3; 11,3-19,5 | 0,032 |
| <i>MIR-34c</i> | 1,3; 1,2-2,1 | 7,2; 2,7-18,2 | 13,8-11,2-20,1 | 0,014 |
| <i>MIR-375</i> | 1,8; 1,0-10,9 | 12,0; 11,0-17,0 | 18,6; 11,8-26,0 | 0,06; _{1vs3} 0,02 |
| <i>MIR-9-1</i> | 0,6; 0,5-5,6 | 20,7; 0,6-20,8 | 13,0; 9,1-21,4 | 0,007 |
| <i>MIR-9-3</i> | 8,6; 2,3-8,7 | 7,2; 2,7-7,6 | 38,8; 18,7-50,4 | 0,045 |
| <i>MIR-339</i> | 3,9; 3,8-3,9 | 21,5; 12,5-26,5 | 22,5; 7,9-43,8 | 0,009 |

Как следует из данных таблицы 42, дисперсионным анализом подтверждено статистически значимое ($p < 0,05$) повышение уровня метилирования группы из 9

генов микроРНК в опухоли больных РЯ при увеличении стадии заболевания: *MIR-124a-2*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-34b*, *MIR-34c*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*.

При этом важно отметить, что медианы генов микроРНК *MIR-127* и *MIR-9-1* были наибольшими при IIb, IIIa и IIIb стадиях и несколько меньше при IIIc стадии РЯ по FIGO (Рисунок 18).

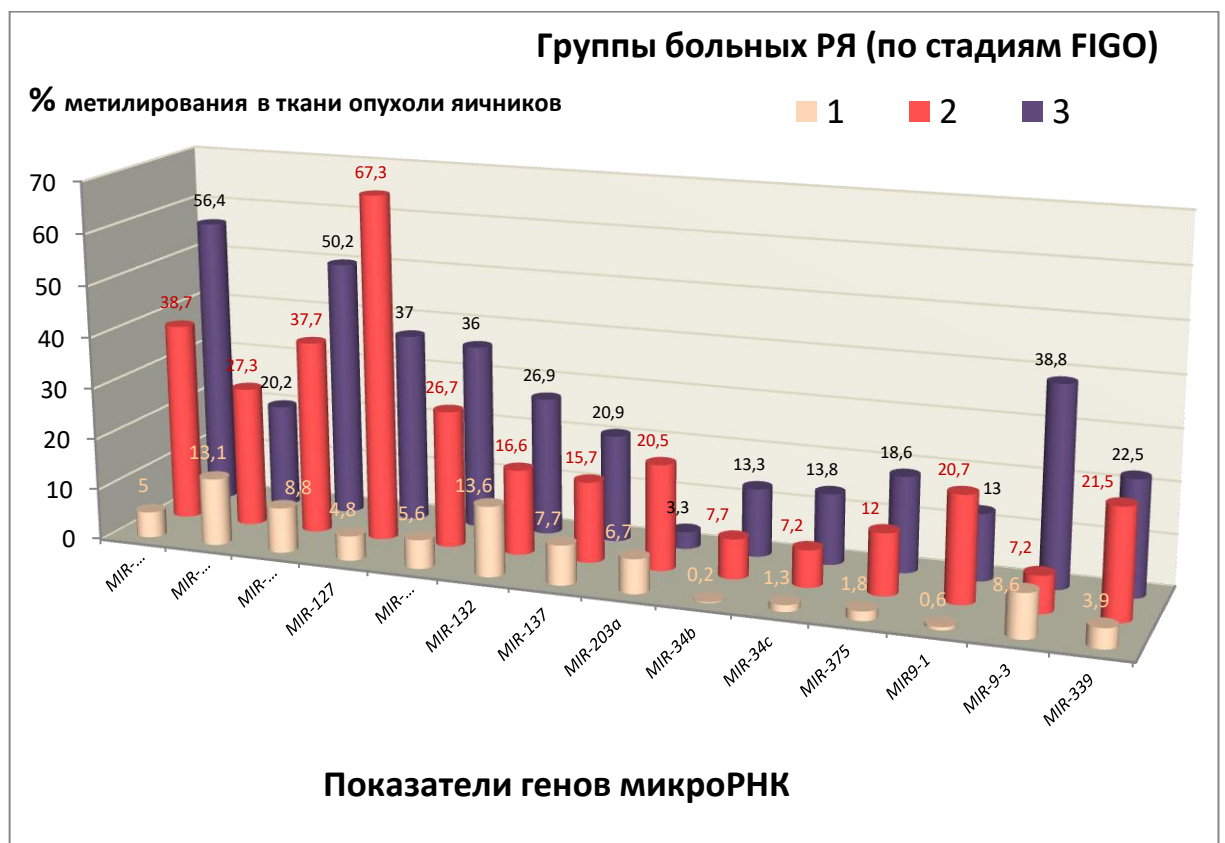


Рисунок 18 – Медианы метилирования генов микроРНК в опухоли больных раком яичников в зависимости от стадии заболевания

Не оценивали уровни метилирования генов микроРНК в зависимости от критериев N и M системы TNM из-за малочисленности групп пациентов.

В таблице 43 представлены результаты уровней метилирования генов микроРНК в группах больных РЯ с отсутствием и наличием метастазов в большом сальнике (из 18 наблюдений у 17 метастазы были более 2 см).

Таблица 43 – Уровни метилирования генов микроРНК в опухоли больных раком яичников в зависимости от наличия метастазов в большом сальнике

| микроРНК в опухоли яичников | Группы | | P |
|-----------------------------------|--|---|-------|
| | ¹ Нет метастазов в б/с (n=8) | ² Есть метастазы в б/с (n=18) | |
| | Метилирование микроРНК (%) | | |
| | Медиана; квартили | Медиана; квартили | |
| <i>MIR-124a-2</i> | 5,2; 2,0-29,5 | 56,0; 36,6-94,4 | 0,047 |
| <i>MIR-124-3</i> | 17,1; 7,2-31,0 | 20,2; 12,8-32,7 | >0,05 |
| <i>MIR-125b-1</i> | 11,4; 4,9-38,6 | 49,9; 23,1-84,0 | 0,06 |
| <i>MIR-127</i> | 7,9; 3,8-50,4 | 37,0; 29,1-64,8 | >0,05 |
| <i>MIR-129-2</i> | 5,7; 3,1-26,7 | 35,6; 21,4-51,5 | 0,041 |
| <i>MIR-132</i> | 13,6; 6,3-35,3 | 22,0; 3,7-50,0 | >0,05 |
| <i>MIR-137</i> | 9,4; 2,7-15,7 | 20,9; 13,5-32,3 | >0,05 |
| <i>MIR-203a</i> | 6,8; 4,0-11,5 | 3,3; 1,6-17,6 | >0,05 |
| <i>MIR-34b</i> | 0,7; 0,1-15,3 | 12,8; 9,0-19,5 | 0,06 |
| <i>MIR-34c</i> | 2,1; 1,2-18,2 | 12,3; 7,2-20,1 | >0,05 |
| <i>MIR-375</i> | 10,9; 1,0-12,0 | 18,0; 11,8-26,0 | 0,047 |
| <i>MIR-9-1</i> | 0,6; 0,5-7,4 | 13,0; 9,1-21,4 | 0,016 |
| <i>MIR-9-3</i> | 7,6; 2,3-8,7 | 29,0; 18,4-50,4 | 0,041 |
| <i>MIR-339</i> | 3,9; 3,8-12,5 | 22,5; 7,9-43,8 | 0,03 |

Как следует из данных таблицы 43, медианы уровней метилирования генов в опухоли больных РЯ большинства изучаемых микроРНК были выше в группе с наличием метастазов в большом сальнике (за исключением *MIR-203a*). Из них 6 генов (*MIR-124a-2*, *MIR-129-2*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*) значимо отражали наличие метастазов в большом сальнике и еще гены 2-х микроРНК

показали сильную тенденцию к различию медиан (*MIR-125b-1*, *MIR-34b*) (Рисунок 19).

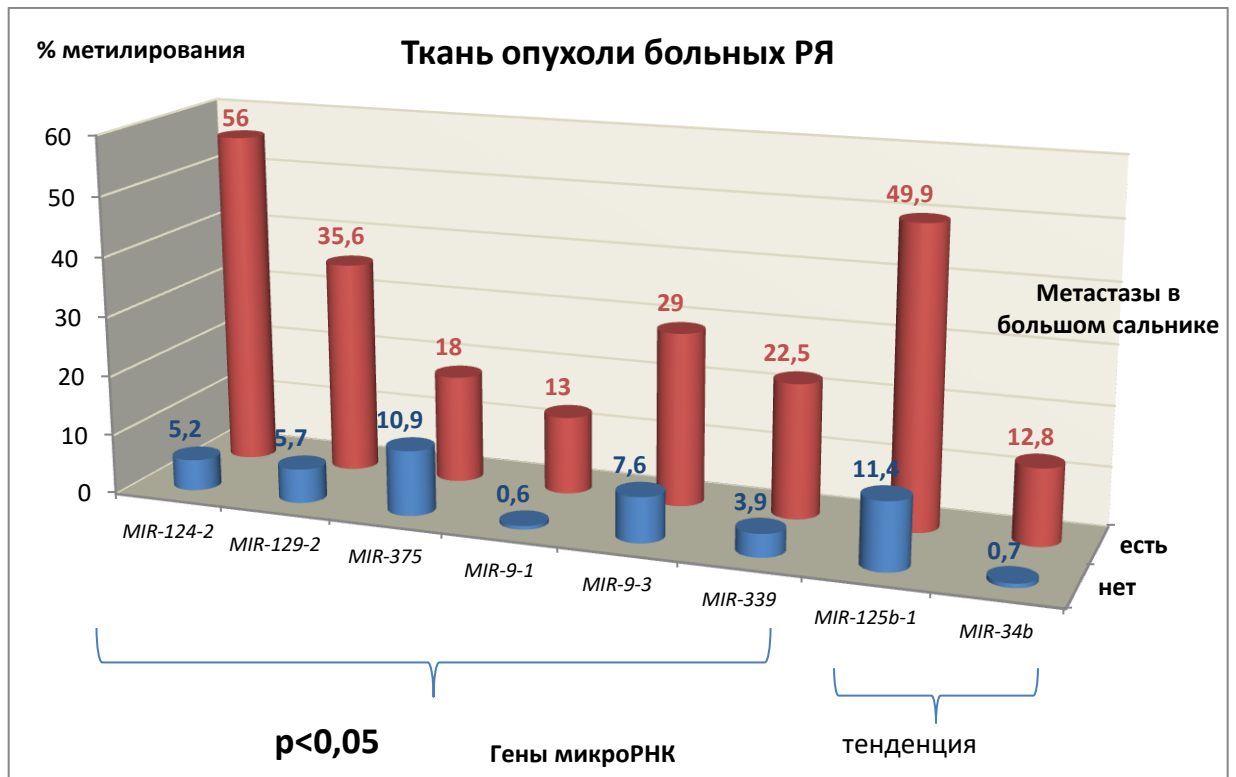


Рисунок 19 – Медианы уровня метилирования генов микроРНК в первичной опухоли больных раком яичников в зависимости от наличия метастазов в большом сальнике

Рассчитали статистические характеристики уровней метилирования генов микроРНК в ткани опухоли больных РЯ в группах с отсутствием и наличием диссеминации процесса по брюшине, а также с учетом размера диссеминатов.

Как следует из данных таблицы 44, только ген *MIR-132* в опухоли больных РЯ можно считать значимо отражающим наличие и размер диссеминатов опухоли по брюшине (Рисунок 20).

Следует также отметить сильную тенденцию к различию медиан уровня метилирования генов микроРНК *MIR-124a-2*, *MIR-129-2*.

Таблица 44 – Уровни метилирования генов микроРНК в опухоли больных раком яичников в зависимости от наличия и размеров диссеминатов опухоли по брюшине

| микроРНК в опухоли яичников | Обследованные группы | | | P |
|-----------------------------------|---|--|---|-------|
| | ¹ Нет диссеминации (n=7) | ² Диссеминаты менее 1 см (n=10) | ³ Диссеминаты более 1 см (n=9) | |
| | Метилирование микроРНК (%) | | | |
| | Медиана; квартили | Медиана; квартили | Медиана; квартили | |
| <i>MIR-124a-2</i> | 10,9; 2,0-93,2 | 38,7; 36,8-56,0 | 94,4; 63,3-96,0 | 0,068 |
| <i>MIR-124-3</i> | 17,9; 13,1-54,3 | 15,2; 8,6-27,3 | 24,2; 14,2-40,0 | >0,05 |
| <i>MIR-125b-1</i> | 38,6; 4,9-64,4 | 24,9; 20,2-82,7 | 50,2; 23,1-81,1 | >0,05 |
| <i>MIR-127</i> | 4,8; 1,9-88,4 | 36,4; 24,0-81,9 | 51,1; 36,4-64,8 | >0,05 |
| <i>MIR-129-2</i> | 15,2; 5,6-27,0 | 24,5; 18,5-35,6 | 50,2; 36,0-54,7 | 0,08 |
| <i>MIR-132</i> | 6,5; 1,9-26,9 | 11,0; 3,7-35,3 | 50,0; 44,3-90,7 | 0,017 |
| <i>MIR-137</i> | 14,3; 2,7-46,6 | 21,3; 11,1-42,7 | 17,6; 15,7-21,1 | >0,05 |
| <i>MIR-203a</i> | 5,0; 3,3-7,3 | 11,5; 1,2-35,3 | 8,4; 1,9-12,6 | >0,05 |
| <i>MIR-34b</i> | 13,9; 0,2-18,1 | 11,3; 2,0-18,5 | 12,5; 9,0-23,5 | >0,05 |
| <i>MIR-34c</i> | 13,8; 1,3-25,3 | 12,3; 2,7-18,4 | 12,3; 2,5-23,5 | >0,05 |
| <i>MIR-375</i> | 12,0; 1,8-23,2 | 17,0; 11,0-27,1 | 15,9; 9,0-23,3 | >0,05 |
| <i>MIR-9-1</i> | 7,4; 0,5-24,2 | 20,1; 9,1-24,0 | 9,1; 9,0-9,2 | >0,05 |
| <i>MIR-9-3</i> | 40,0; 8,6-52,5 | 9,0; 2,7-39,7 | 26,8; 18,4-50,4 | >0,05 |
| <i>MIR-339</i> | 9,8; 3,9-26,5 | 25,0; 7,5-34,1 | 10,9; 7,9-12,5 | >0,05 |

Не установлено статистически значимой связи уровней метилирования генов микроРНК в опухоли больных РЯ с наличием асцита. Однако наибольшие различия медиан отмечены для гена *MIR-124a-2*. Так, если в группе из 10 больных без асцита медиана уровня метилирования этого гена равнялась 29,5; 10,9-93,2%,

то в группе из 16 пациенток с асцитом была почти в 2 раза выше и составила 56,0; 35,4-94,4% ($p=0,16$). Не оценивали связь уровней метилирования генов микроРНК с наличием опухолевых клеток в смывах из брюшной полости из-за малого количества таких наблюдений.

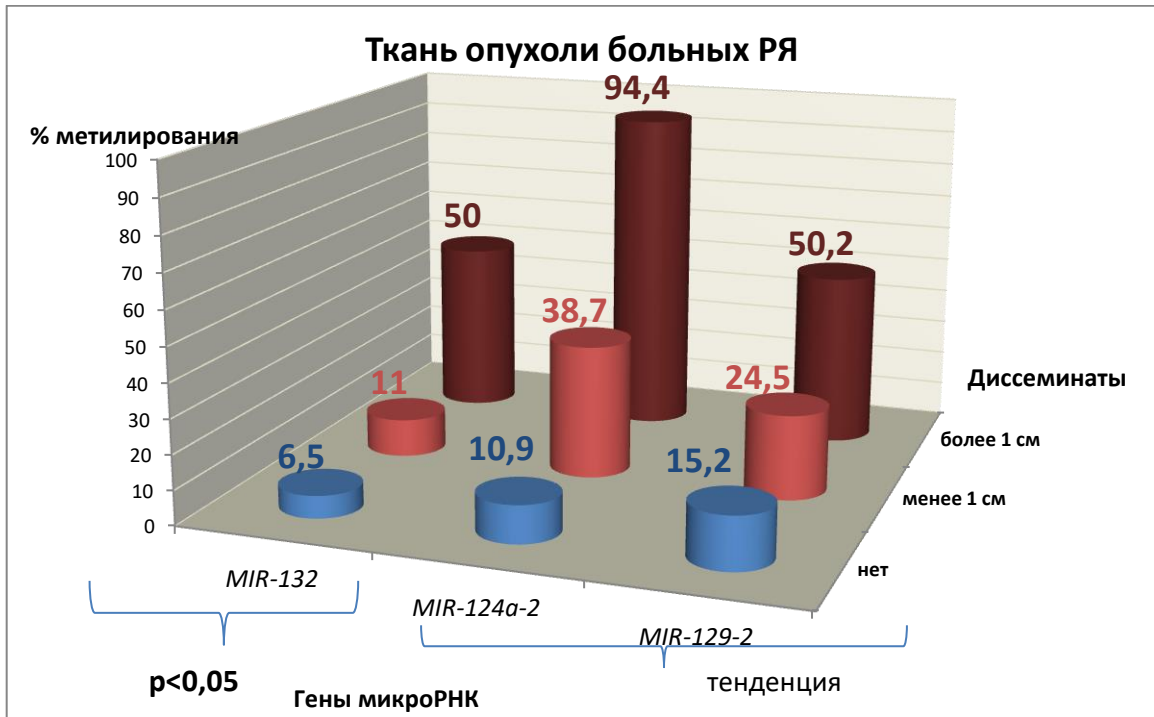


Рисунок 20 – Медианы уровня метилирования генов микроРНК в опухоли в зависимости от наличия и размеров диссеминатов по брюшине у больных раком яичников

Таким образом, большинство генов микроРНК значимо отражали стадию заболевания (критерий распространенности T): *MIR-124a-2*, *MIR-125b-1*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-34b*, *MIR-34c*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339* (ткань опухоли). Кроме того, гены микроРНК *MIR-124a-2*, *MIR-129-2*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339* (ткань опухоли) статистически значимо отражали наличие метастазов РЯ в большом сальнике, а ген микроРНК *MIR-132* (ткань опухоли) – наличие диссеминации опухолевого процесса по брюшной полости.

Изучили связь уровней метилирования генов микроРНК со степенью дифференцировки РЯ (Таблица 45; Рисунок 21; Рисунок 22). В опухолях яичников чаще выявляли бóльшие уровни метилирования генов микроРНК при G3, однако

только ген *MIR-375* показал значимо различающиеся медианы при умеренной (10,9%) и низкой (21%) степени дифференцировки новообразования, в то же время гены *MIR-9-1* и *MIR-9-3* показали только тенденцию к различию медиан.

В ткани метастазов, напротив, при G3 чаще выявляли меньшие уровни метилирования генов микроРНК. При этом, медианы метилирования генов *MIR-124-3* и *MIR-339* значимо различались, а *MIR-132* показал тенденцию к меньшей медиане при G3.

Таблица 45 – Уровни метилирования генов микроРНК в ткани опухоли и метастазов больных раком яичников в группах с умеренной (G2) и низкой степенью дифференцировки (G3) опухоли

| микроРНК | Ткань опухоли яичников | | | Ткань метастазов | | |
|-------------------|------------------------|--------------------|-------|--------------------|--------------------|-------|
| | G2 n=11 | G3 n=13 | p | G2 n=7 | G3 n=12 | P |
| <i>MIR-124a-2</i> | 38,7; 5,2-96,4 | 47,5; 35,8-63,3 | >0,05 | 50,8; 40,2-90,4 | 33,9; 19,9-66,6 | >0,05 |
| <i>MIR-124-3</i> | 20,2; 13,1-40 | 15,6; 12,8-30,3 | >0,05 | 36,9; 18,5-68,9 | 13,6; 7,7-32,6 | 0,045 |
| <i>MIR-125b-1</i> | 37,7; 8,8-81,1 | 49,9; 23,1-82,7 | >0,05 | 44,0; 13,0-85,7 | 44,4; 11,8-66,3 | >0,05 |
| <i>MIR-127</i> | 50,4; 4,8-76,4 | 36,9; 24-51,1 | >0,05 | 46,9; 24,7-74,9 | 47,3; 26,7-68,6 | >0,05 |
| <i>MIR-129-2</i> | 27,0; 5,7-51,5 | 27,0; 18,5-50,2 | >0,05 | 54,8; 28,7-82,9 | 27,1; 17,8-34,9 | >0,05 |
| <i>MIR-132</i> | 16,6; 6,5-37,7 | 36,3; 1,9-50,0 | >0,05 | 63,7; 30,0-71,6 | 9,1; 1,7-30,2 | 0,14 |
| <i>MIR-137</i> | 14,3; 2,9-43,6 | 20,9; 16,2-24,9 | >0,05 | 19,3; 8,7-53,9 | 23,6; 15,2-39,3 | >0,05 |

| | | | | | | |
|-----------------|-------------------|--------------------|-------|--------------------|--------------------|-------|
| <i>MIR-203a</i> | 6,8; 3,3-20,5 | 3,3; 1,6-16,6 | >0,05 | 56,3; 2,7-76,3 | 4,6; 0,5-27,3 | >0,05 |
| <i>MIR-34b</i> | 7,7; 0,7-23,5 | 12,8; 11,3-16,3 | >0,05 | 20,1; 3,4-54,0 | 12,9; 11,1-50,3 | >0,05 |
| <i>MIR-34c</i> | 7,2; 1,3-23,5 | 12,3; 11,2-18,4 | >0,05 | 20,3; 2,4-52,2 | 12,3; 11,1-50,2 | >0,05 |
| <i>MIR-375</i> | 10,9; 3,3-17,0 | 21,0; 15,9-27,1 | 0,004 | 26,9; 4,7-43,2 | 27,0; 8,8-45,1 | >0,05 |
| <i>MIR-9-1</i> | 9,1; 0,6-20,7 | 20,0; 9,1-21,4 | 0,16 | 20,1; 8,9-44,9 | 11,1; 5,6-24,9 | >0,05 |
| <i>MIR-9-3</i> | 8,7; 17,2-39,7 | 38,8; 18,4-52,5 | 0,11 | 13,5; 9,2-34,4 | 25,8; 9,3-28,6 | >0,05 |
| <i>MIR-339</i> | 11,8; 3,9-26,5 | 22,5; 7,9-32,8 | >0,05 | 45,6; 29,5-56,1 | 16,7; 8,8-22,8 | 0,036 |

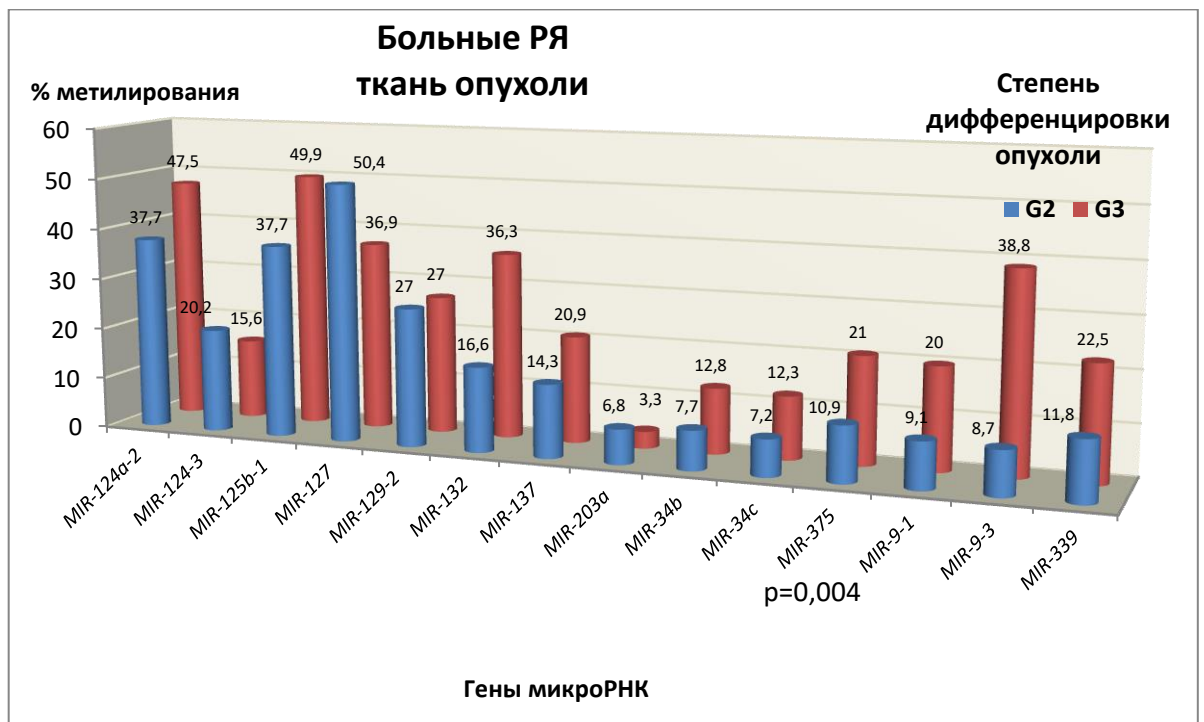


Рисунок 21 – Медиана уровней метилирования генов микроРНК в опухоли больных раком яичников с учетом степени дифференцировки опухоли

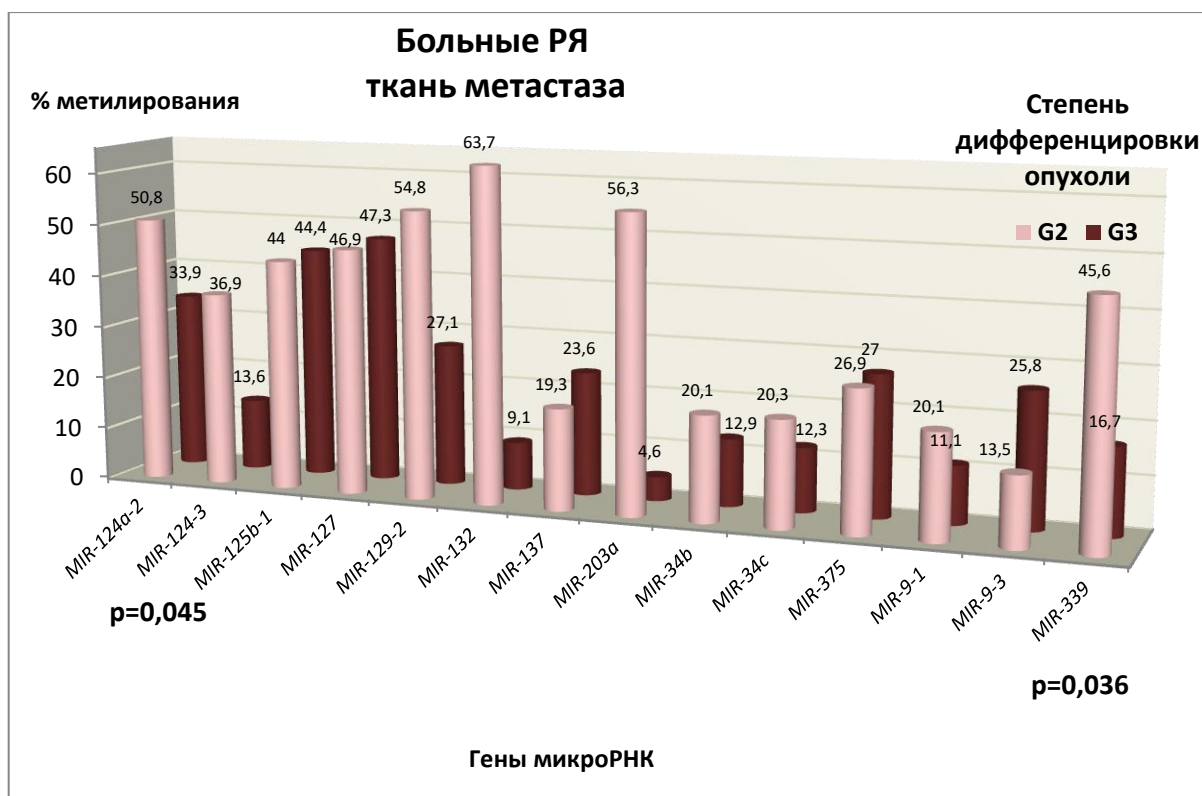


Рисунок 22 – Медиана уровней метилирования генов микроРНК в метастазах больных раком яичников с учетом степени дифференцировки опухоли

Не изучали связь уровней метилирования генов микроРНК с гистологическим строением опухоли, из-за преобладания в исследовании больных серозной аденокарциномой яичников.

4.3. Уровень экспрессии генов микроРНК у больных раком яичников

Экспрессия генов микроРНК определена в ткани опухоли относительно неизменной ткани яичников у 16 больных РЯ. У 9 из 16 больных РЯ показатели также определены одновременно и в ткани опухоли, и в ткани метастаза.

Рассчитали статистические характеристики показателей экспрессии микроРНК, исследованные в ткани опухоли у 16 больных РЯ (Таблица 46; Рисунок 23). Медианы всех показателей экспрессии были отрицательными, что указывает на сниженную экспрессию гиперметилированных генов микроРНК и

подтверждает функциональную значимость метилирования в подавлении экспрессии генов микроРНК в опухолях.

Таблица 46 – Показатели экспрессии микроРНК в ткани опухоли больных раком яичников

| микроРНК | Медиана | Квартили | Пределы |
|-------------------|---------|-------------|--------------|
| <i>MIR-124a-2</i> | -2,4 | -8,8 – 3,4 | -27,6 – 78,7 |
| <i>MIR-127</i> | -1,5 | -4,4 – 1,9 | -17,5 – 7,9 |
| <i>MIR-129-2</i> | -2,5 | -3,6 – -1,5 | -34,5 – 2,4 |
| <i>MIR-132</i> | -2,1 | -3,1 – 1,4 | -8,6 – 1,8 |
| <i>MIR-9-1</i> | -1,7 | -4,9 – 1,3 | -12,2 – 4,5 |
| <i>MIR-9-3</i> | -3,9 | -8,2 – -0,1 | -40,6 – 2,1 |
| <i>MIR-125b-1</i> | -1,3 | -4,7 – 1,1 | -20,4 – 13,1 |
| <i>MIR-137</i> | -1,4 | -5,4 – 2,3 | -19,8 – 161 |
| <i>MIR-203a</i> | -2,2 | -5,3 – -1,3 | -17,5 – 4,6 |
| <i>MIR-375</i> | -2,0 | -5,7 – 2,7 | -34,1 – 39,4 |
| <i>MIR-34b</i> | -1,6 | -3,4 – 2,3 | -47,1 – 20,3 |
| <i>MIR-339</i> | -2,3 | -2,9 – 1,2 | -5,2 – 1,7 |

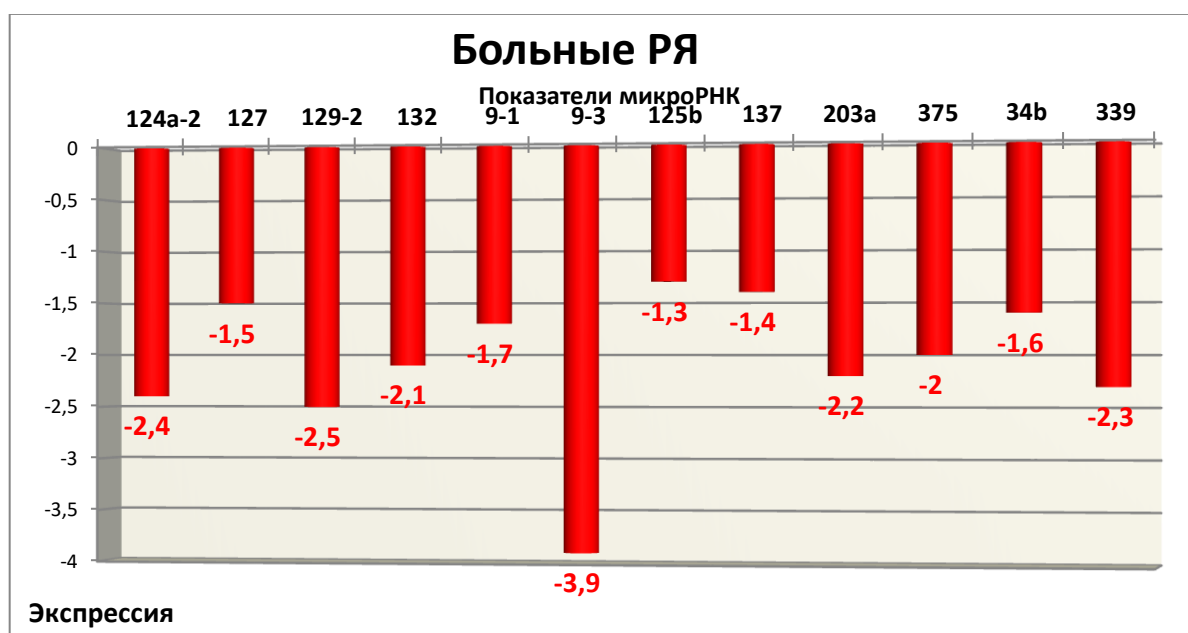


Рисунок 23 – Медианы экспрессии маркеров микроРНК в ткани опухоли

Рассчитали корреляционные коэффициенты между экспрессией генов микроРНК, определенные у 16 больных РЯ. Значимые результаты представлены в таблице 47.

Таблица 47 – Корреляционные зависимости между экспрессией генов микроРНК в ткани опухоли больных раком яичников

| Корреляции показателей экспрессии микроРНК | r_s | P |
|--|-------|-------|
| <i>MIR-129-2 & MIR-125b-1</i> | 0,64 | <0,05 |
| <i>MIR-129-2 & MIR-34b</i> | -0,52 | <0,05 |
| <i>MIR-132 & MIR-203a</i> | 0,51 | <0,05 |
| <i>MIR-9-1 & MIR-339</i> | 0,63 | <0,05 |

Выявлена позитивная корреляция между уровнями экспрессии в опухолях РЯ для попарных сочетаний генов *MIR-129-2 & MIR-125b-1*, *MIR-132 & MIR-203a*, а также *MIR-9-1 & MIR-339* ($r_s=0,51-0,64$; $p<0,05$), показывающая сопряженность между экспрессией микроРНК в этих парах и их возможное участие в общих процессах.

4.4. Связь показателей метилирования и экспрессии генов микроРНК с концентрациями плазменных маркеров sPD-1 и sPD-L1 у больных раком яичников

Рассчитали корреляционные зависимости между экспрессией генов микроРНК в опухоли с концентрациями sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных РЯ. Не выявили статистически значимой связи экспрессии генов микроРНК с концентрациями sPD-1 и sPD-L1, установлена тенденция к наличию обратной линейной зависимости между концентрацией sPD-1 в плазме крови больных РЯ и экспрессией в ткани опухоли маркера микроРНК *MIR-9-3* ($r_s=-0,43$; $p>0,05$).

Тенденция к наличию прямой связи установлена для маркера микроРНК *MIR-9-3* и концентрацией sPD-L1 в плазме крови ($r_s=0,43$; $p=0,16$) (Таблица 48).

Таблица 48 – Корреляционные зависимости между экспрессией маркеров микроРНК в опухоли и концентрациями sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных раком яичников

| Корреляции между экспрессией микроРНК и концентрациями sPD-1 и sPD-L1 | r_s | P |
|---|-------|-------|
| sPD-1(пг/мл) & <i>MIR-127</i> (экспрессия) | -0,38 | >0,05 |
| sPD-1(пг/мл) & <i>MIR-129-2</i> (экспрессия) | -0,40 | >0,05 |
| sPD-1(пг/мл) & <i>MIR-9-3</i> (экспрессия) | -0,43 | >0,05 |
| sPD-1(пг/мл) & <i>MIR-339</i> (экспрессия) | -0,43 | >0,05 |
| sPD-L1 (пг/мл) & <i>MIR-124a-2</i> (экспрессия) | 0,46 | >0,05 |
| sPD-L1 (пг/мл) & <i>MIR-9-3</i> (экспрессия) | 0,43 | >0,05 |

Рассчитали экспрессию генов микроРНК в ткани опухоли больных РЯ в группах пациенток, разделенных по медиане концентрации sPD-L1 (Таблица 49) и sPD-1 (Таблица 50). Выявлена тенденция к меньшей экспрессии гена микроРНК *MIR-9-3* у больных с невысокими концентрациями sPD-L1 менее 44,4 пг/мл (медиана экспрессии составила -5,5) по сравнению с таковой у пациенток с концентрациями sPD-L1 более 44,4 пг/мл (медиана экспрессии составила 1,8) ($p=0,09$). Экспрессия других генов микроРНК в указанных группах различалась незначимо.

Таблица 49 – Экспрессия маркеров микроРНК в опухоли с различными концентрациями sPD-L1 в плазме крови

| микроРНК | Экспрессия (Медиана; квартили) | | P |
|-------------------|--------------------------------|-------------------|------|
| | sPD-L1<44,4 (n=8) | sPD-L1≥44,4 (n=7) | |
| <i>MIR-124a-2</i> | -5,5; -14,2 – 1,0 | -1,1; -5,0 – 6,4 | 0,29 |
| <i>MIR-127</i> | -3,2; -4,6 – 0,3 | -1,4; -2,6 – 1,6 | 0,54 |

| | | | |
|-------------------|--------------------|-------------------|------|
| <i>MIR-129-2</i> | -3,1; -3,6 – -0,4 | -2,2; -3,4 – -1,2 | 0,69 |
| <i>MIR-132</i> | -3,1; -4,7 – 1,6 | -1,3; -2,7 – 1,2 | 0,40 |
| <i>MIR-9-1</i> | -1,7; -4,0 – 1,3 | -1,5; -5,7 – 3,0 | 0,78 |
| <i>MIR-9-3</i> | -5,5; -12,3 – -3,1 | -1,8; -4,6 – 1,6 | 0,09 |
| <i>MIR-125b-1</i> | -1,8; -13,9 – 1,2 | -1,3; -4,7; – 1,1 | 0,80 |
| <i>MIR-137</i> | -2,2; -13,2 – 3,8 | -1,7; -4,6 – 2,6 | 0,69 |
| <i>MIR-203a</i> | -4,9; -10,8 – -1,3 | -2,0; -2,3 – 1,2 | 0,34 |
| <i>MIR-375</i> | 1,8; -16,8 – 5,9 | -2,7; -7,2 – 2,5 | 0,54 |
| <i>MIR-34b</i> | -1,6; -21,8 – 0,5 | -1,8; -4,7 – 2,2 | 0,69 |
| <i>MIR339</i> | -2,5; -2,9; – -0,4 | -2,3; -4,0 – 1,3 | 0,78 |

Выявлена значимо меньшая экспрессия гена микроРНК *MIR-339* у больных с невысокими концентрациями sPD-1 менее 49,9 пг/мл (медиана экспрессии составила -3,7) по сравнению с таковой у пациенток с концентрациями sPD-1 более 49,9 пг/мл (медиана экспрессии составила -2,1) ($p=0,035$; Таблица 50). Экспрессия других генов микроРНК в указанных группах различалась незначимо либо была сопоставимой.

Таблица 50 – Экспрессия генов микроРНК в опухоли с различными концентрациями sPD-1 в плазме крови

| микроРНК | Экспрессия (Медиана; квартили) | | P |
|-------------------|--------------------------------|--------------------|------|
| | sPD-1 < 49,9 (n=6) | sPD-1 ≥ 49,9 (n=9) | |
| <i>MIR-124a-2</i> | -3,0; -16,4 – 1,5 | -3,5; -5,5 – 6,4 | 0,78 |
| <i>MIR-127</i> | -1,5; -2,6 – 4,8 | -2,1; -4,6 – 1,5 | 0,39 |
| <i>MIR-129-2</i> | -1,7; -2,8 – -1,1 | -3,4; -3,6 – -1,9 | 0,27 |
| <i>MIR-132</i> | -1,9; -5,5 – 1,0 | -2,7; -3,1 – 1,6 | 0,69 |
| <i>MIR-9-1</i> | -4,4; -6,7 – -1,6 | 1,3; -1,8 – 1,3 | 0,11 |
| <i>MIR-9-3</i> | -0,3; -2,4 – 1,6 | -4,6; -10,0 – -4,0 | 0,07 |

| | | | |
|-------------------|-------------------|--------------------|-------|
| <i>MIR-125b-1</i> | 1,1; -1,4 – 1,2 | -1,8; -13,9 – -1,3 | 0,19 |
| <i>MIR-137</i> | -0,2; -3,4 – 2,0 | -2,0; -6,5 – 5,6 | 0,69 |
| <i>MIR-203a</i> | -1,3; -2,7 – 1,2 | -2,3; -8,0 – -1,8 | 0,32 |
| <i>MIR-375</i> | -0,8; -4,1 – 2,5 | -1,7; -31,1 – 3,0 | 0,9 |
| <i>MIR-34b</i> | -1,8; -4,7 – -1,3 | -1,6; -2,0 – 2,3 | 0,78 |
| <i>MIR-339</i> | -3,7; -5,2 – -2,3 | -2,1; -2,5 – 1,3 | 0,035 |

Таким образом, снижение уровня экспрессии гена *MIR-339* в опухолях значимо ($p=0,035$) ассоциировано со снижением уровня sPD-1 в плазме крови.

4.5. Связь уровней экспрессии генов микроРНК с прогрессией заболевания

Изучена связь уровней экспрессии генов микроРНК с прогрессией заболевания. Отмечено, что наиболее различались медианы экспрессии гена микроРНК *MIR-125b-1* в ткани опухоли и составили (1,1; -0,08 – 7,2) в группе из 4 больных с Ic стадией РЯ, (-19,9; -20,4 – -1,8) в группе из 3 больных с Ib стадией и (-1,3; -4,7 – -0,1) в группе из 9 больных с IIIc стадией. В то же время медианы экспрессии гена микроРНК *MIR-127* в ткани опухоли снижались по мере увеличения стадии заболевания и составили (2,3; -0,3 – 5,2) в группе из 4 больных с Ic стадией РЯ, (-2,1; -17,5 – 1,7) в группе из 3 больных с Ib стадией и (-2,6; -4,6 – -1,4) в группе из 9 больных с IIIc стадией. В то же время медиана экспрессии гена микроРНК *MIR-124a-2*, напротив, была наименьшей (-7,7; -14,2 – -1,0) в группе из 4 больных с Ic стадией РЯ, равнялась (14,7; -27,6 – 78,7) в группе из 3 больных с Ib стадией и составила (-1,4; -5,5 – 1,5) в группе из 9 больных с IIIc стадией. Итак, не было выявлено значимой связи уровней экспрессии генов микроРНК с повышением клинической стадии, что вероятно, связано с недостаточной выборкой.

Установлена тенденция к различию медиан экспрессии генов микроРНК *MIR-127* и *MIR-339* в группах больных РЯ с различной степенью дифференцировки опухоли. Так, медиана экспрессии гена микроРНК *MIR-127* у 7 больных с G2 составила (-1,4; -2,1 – 2,0), тогда как у 7 больных с G3 она снижалась и равнялась (-4,2; -4,6 – -1,6) ($p=0,07$). Медиана экспрессии гена микроРНК *MIR-339* у 7 больных с G2 составила (1,0; -2,5 – 1,6), тогда как у 7 больных с G3 была ниже и составила (-2,5; -5,2 – -2,3) ($p=0,09$).

Выявлены значимые различия экспрессии гена микроРНК *MIR-34b* в ткани опухоли больных с наличием и отсутствием асцита ($p=0,003$). Так, медиана экспрессии гена микроРНК *MIR-34b* у 7 больных без асцита составила (2,3; -1,6 – 15,0), тогда как у 9 больных с асцитом была ниже и составила (-2,0; -21,0 – -1,7).

Выявлено статистически значимое различие уровней экспрессии гена микроРНК *MIR-339* в ткани опухоли у больных с наличием и отсутствием метастазов в большом сальнике ($p<0,05$). Так, медиана экспрессии гена микроРНК *MIR-339* у 6 больных без метастазов в большом сальнике составила (0; -2,1 – 1,6), тогда как у 10 больных с таковыми была ниже и составила (-2,5; -4,0 – -2,3).

Выявлены значимые различия экспрессии гена микроРНК *MIR-127* в ткани опухоли у больных РЯ с наличием и отсутствием диссеминации опухоли по брюшине ($p<0,05$). Так, медиана экспрессии гена микроРНК *MIR-127* у 6 больных без диссеминации составила (1,9; -1,4 – 4,8), тогда как у 10 больных с диссеминацией была ниже и составила (-2,4; -4,6 – -1,4).

Таким образом, выявлено дальнейшее снижение экспрессии некоторых генов микроРНК по мере прогрессии заболевания. Установлена значимая связь снижения уровней экспрессии генов микроРНК в опухолях со снижением степени дифференцировки для гена *MIR-127* ($p=0,07$, маргинально значимо), с появлением асцита – для гена *MIR-34b* ($p=0,003$), с появлением метастазов в большом сальнике – для гена *MIR-339* ($p<0,05$), с диссеминацией опухоли по брюшине – для гена *MIR-127* ($p<0,05$).

ГЛАВА 5. ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ ЯИЧНИКОВ

На первом этапе нами был выполнен анализ безрецидивной выживаемости больных ЗОЯ общей группы, состоящей из 93 пациенток. Следует отметить, что через 2,5 года почти у половины больных ЗОЯ ($45,8 \pm 6,4\%$) был выявлен рецидив заболевания в виде продолженного роста остаточной опухоли либо развития метастазов (медиана срока выявления рецидива на 3-летнем периоде наблюдения не определена) (Таблица 51).

Таблица 51 – Безрецидивная выживаемость больных злокачественными опухолями яичников в общей группе

| Сроки наблюдения (мес.) | Безрецидивная выживаемость (%) |
|-------------------------|--------------------------------|
| 6 | $94,4 \pm 2,4$ |
| 12 | $77,7 \pm 4,4$ |
| 18 | $63,2 \pm 5,2$ |
| 24 | $59,9 \pm 5,4$ |
| 30 | $54,2 \pm 6,4$ |
| 36 | $54,2 \pm 6,4$ |

5.1. Безрецидивная выживаемость больных злокачественными опухолями яичников в зависимости от клинических факторов

В таблице 52 представлены данные безрецидивной выживаемости больных ЗОЯ в зависимости от основных клинических факторов заболевания. Как следует из данных таблицы, фактором, определяющим сроки развития рецидива, была стадия заболевания ($p=0,00014$). При этом, существенное снижение отдаленных результатов лечения наблюдали при IIIa, IIIb стадиях 3-летняя безрецидивная выживаемость снижалась до $32,3 \pm 15,9\%$, медиана срока выявления рецидива

равнялась 17,3 мес., тогда как при меньших стадиях рецидив выявляли в пределах от 0 до 28,6% больных ЗОЯ.

Таблица 52 – Безрецидивная выживаемость больных злокачественными опухолями яичников в зависимости от основных клинических факторов заболевания

| Фактор | Градация | N | Медиана срока рецидива (мес.) | Безрецидивная выживаемость (%) | | |
|------------------------------|----------------------|----|--|-----------------------------------|-----------|-----------|
| | | | | 1-летняя | 2-летняя | 3-летняя |
| FIGO | Ia, Ib, Ic | 23 | Не опр. | 95,8±4,1 | 95,8±4,1 | 95,8±4,1 |
| | IIb, IIc | 10 | Не опр. | 83,3±10,8 | 71,4±14,4 | 71,4±14,4 |
| | IIIa, IIIb | 13 | 17,3 | 76,9±11,7 | 59,8±14,0 | 32,3±15,9 |
| | IIIc | 42 | 14,5 | 63,6±8,4 | 34,1±8,5 | 26,3±8,2 |
| | IV | 5 | 14,6 | 60,0±21,9 | 40,0±21,9 | 22,4±21,9 |
| G p=0,024 | G1 | 15 | Не опр. | 91,7±8,0 | 91,7±8,0 | 91,7±8,0 |
| | G2 | 24 | Не опр. | 79,3±8,2 | 75,1±8,8 | 65,7±11,7 |
| | G3 | 54 | 14,9 | 65,5±7,2 | 36,3±7,7 | 27,7±8,0 |
| Гистол. Вариант p=0,14 | Серозный | 74 | 25,1 | 76,7±5,5 | 54,8±6,7 | 44,1±7,9 |
| | Эндомет- риоидный | 11 | Не опр. | 70,7±12,4 | 61,9±13,6 | 61,9±13,6 |
| | Муцинозный | 6 | Не опр. | 100 | 100 | 100 |
| Mтс в б/с p=0,0009 | Нет | 35 | Не опр. | 92,2±4,3 | 89,1±5,2 | 89,1±5,2 |
| | До 2 см | 14 | 22,0 | 75,0±12,5 | 65,6±14,0 | 32,8±24,2 |
| | 2-5 см | 41 | 13,6 | 56,5±10,3 | 31,6±10,2 | 31,6±10,2 |
| | панцирный | 3 | 12,8 | 60,0±21,9 | 30,0±23,8 | 30,0±23,8 |
| Диссем. p=0,03 | Нет | 32 | Не опр. | 85,7±5,9 | 79,9±6,8 | 79,9±6,8 |
| | До 1 см | 39 | Не опр. | 76,8±9,1 | 70,4±10,4 | 56,3±15,1 |
| | Более 1 см | 22 | 15,4 | 62,0±10,6 | 38,7±11,5 | 29,0±12,0 |

| | | | | | | |
|------------------------------|---------|----|---------|-----------|-----------|-----------|
| Асцит p=0,009 | Нет | 37 | Не опр. | 86,5±5,1 | 76,3±6,6 | 67,8±9,9 |
| | Есть | 38 | 16,9 | 69,6±6,8 | 48,3±7,6 | 41,0±8,1 |
| СА-125, Ед/мл p=0,17 | <35 | 5 | Не опр. | 75,0±15,2 | 75,0±15,2 | 75,0±15,2 |
| | 35-99 | 10 | Не опр. | 90,9±8,7 | 81,8±11,6 | 54,5±23,6 |
| | 100-499 | 29 | Не опр. | 79,4±6,9 | 61,7±8,9 | 61,7±8,9 |
| | 500-999 | 22 | 25,2 | 81,3±9,8 | 62,5±12,1 | 50,0±14,8 |
| | ≥1000 | 27 | 12,7 | 52,9±12,1 | 40,3±12,1 | 32,3±12,1 |
| HE-4 пкмоль/л p=0,009 | <100 | 8 | Не опр. | 100 | 100 | 100 |
| | ≥100 | 17 | 13,5 | 64,7±11,6 | 39,7±12,2 | 29,8±12,5 |
| Опухолев клетки p=0,18 | Нет | 11 | Не опр. | 85,7±9,4 | 73,6±13,9 | 73,6±13,9 |
| | Есть | 24 | 16,2 | 81,3±9,8 | 48,6±12,8 | 38,9±13,4 |

Следует отметить, что безрецидивная выживаемость больных IIIc и IV стадий, которая была сопоставимой (медианы срока выявления рецидива составили 14,5 и 14,6 месяцев от начала лечения).

Неблагоприятная низкая степень дифференцировки опухоли также значимо снижала показатели безрецидивной выживаемости на 64%. Наличие метастазов в большом сальнике независимо от их размеров значимо снижали 3-летнюю безрецидивную выживаемость больных ЗОЯ на 56,3%-59,1%. Наличие диссеминатов по брюшине размерами более 1 см также значимо снижало показатели 3-летней безрецидивной выживаемости больных ЗОЯ на 50,9%. Значимо неблагоприятный прогноз установлен и в группе больных ЗОЯ с наличием асцита (3-летняя выживаемость снижалась на 26%). При этом, объемы асцитической жидкости в брюшной полости не существенно влияли на безрецидивную выживаемость больных ЗОЯ.

Уровни HE-4 показали хорошую прогностическую значимость. Так, при

высоких значения белка от 100 и более, 3-летняя безрецидивная выживаемость значимо снижалась на 70% ($p=0,009$).

Худшую 3-летнюю безрецидивную выживаемость выявили в группе больных ЗОЯ с серозным гистологическим вариантом строения опухоли ($44,1\pm 7,9\%$).

Наилучшая 3-летняя выживаемость выявлена в группе больных ЗОЯ с уровнями СА-125 в пределах нормы ($75,0\pm 15,2\%$), и наихудшая при высоких уровнях СА-125 (от 1000 и более Ед/л) - $32,3\pm 12,1\%$, однако различия статистически незначимы ($p=0,17$). При обнаружении опухолевых клеток в смывах из брюшной полости 3-летняя безрецидивная выживаемость больных ЗОЯ также снижалась на 34,7%, однако различия статистически незначимы ($p=0,18$).

При многофакторном анализе с включением в модель основных клинических признаков фактором, значимо определяющим безрецидивную выживаемость больных ЗОЯ, была только стадия заболевания ($p=0,0037$). Степень дифференцировки определяла отдаленные результаты лечения больных в меньшей степени ($p=0,24$).

Рассчитали безрецидивную выживаемость больных ЗОЯ в зависимости от данных анамнеза пациенток (Таблица 53).

Таблица 53 – Безрецидивная выживаемость больных злокачественными опухолями яичников в зависимости от данных анамнеза

| Фактор | Градация | N | Медиана срока рецидива (мес.) | Безрецидивная выживаемость (%) | | |
|---------|-----------|----|-------------------------------|--------------------------------|----------------|----------------|
| | | | | 1-летняя | 2-летняя | 3-летняя |
| Возраст | <40 | 9 | Не опр. | $88,9\pm 10,5$ | $77,8\pm 13,9$ | $77,8\pm 13,9$ |
| | 40-49 | 23 | 29,3 | $85,0\pm 8,0$ | $73,2\pm 10,4$ | $48,8\pm 21,1$ |
| | 50-59 | 34 | 21,9 | $71,4\pm 7,6$ | $52,0\pm 8,8$ | $42,0\pm 9,5$ |
| | 60-69 | 19 | Не опр. | $70,6\pm 11,1$ | $52,9\pm 12,1$ | $52,9\pm 12,1$ |
| | ≥ 70 | 8 | Не опр. | $87,5\pm 11,6$ | $75,0\pm 15,3$ | $75,0\pm 15,3$ |
| Наличие | Не было | 9 | Не опр. | $80,0\pm 12,6$ | $80,0\pm 12,6$ | $80,0\pm 12,6$ |

Продолжение таблицы 53

| | | | | | | |
|------------|------|----|---------|-----------|----------|-----------|
| родов | Были | 84 | Не опр. | 76,4±5,2 | 64,6±6,0 | 57,0±7,4 |
| Наличие | Нет | 78 | Не опр. | 74,2±5,4 | 61,9±6,2 | 52,9±8,2 |
| Гин.опер. | Есть | 15 | Не опр. | 90,9± | | |
| Наличие | Нет | 22 | Не опр. | 76,9±11,7 | 69,2±2,8 | 59,3±14,3 |
| сопут.заб. | Есть | 71 | Не опр. | 76,8±5,2 | 65,8±6,1 | 61,1±7,3 |
| Наличие | Нет | 44 | Не опр. | 75,0±7,2 | 72,1±7,5 | 68,1±8,1 |
| абортов | Есть | 49 | Не опр. | 78,5±6,4 | 60,8±8,1 | 52,1±10,6 |

Как следует из данных таблицы 53, не установлено статистически значимой связи показателей безрецидивной выживаемости с анамнезом больных ЗОЯ.

Рассчитали безрецидивную выживаемость больных ЗОЯ в зависимости от методов лечения (Таблица 54).

Таблица 54 – Безрецидивная выживаемость больных злокачественными опухолями яичников в зависимости от факторов лечения

| Фактор | Градация | N | Медиана срока рецидива (мес.) | Безрецидивная выживаемость (%) | | |
|-------------------------------|-------------------|----|--|-----------------------------------|-----------|-----------|
| | | | | 1-летняя | 2-летняя | 3-летняя |
| Вид ОП p=0,00033 | Полная | 46 | Не опр. | 87,0±4,9 | 79,7±6,1 | 72,5±8,8 |
| | Оптимальная | 21 | Не опр. | 83,9±10,4 | 75,5±12,3 | 75,5±12,3 |
| | Не оптимальная | 26 | 11,0 | 47,4±11,5 | 29,6±10,8 | 22,2±10,3 |
| Остат. опухоль p=0,0048 | Нет | 46 | Не опр. | 87,0±5,0 | 79,7±6,1 | 72,5±8,8 |
| | Есть | 47 | 17,6. | 61,8±8,7 | 47,2±9,2 | 41,3±9,8 |

Как видно из представленных данных, 3-летняя безрецидивная выживаемость больных ЗОЯ была значимо хуже при неоптимальной операции (только $22,2 \pm 10,3\%$ с медианой срока выявления рецидива 11 мес.). Этот фактор также определялся распространенностью первичной опухоли.

5.2. Безрецидивная выживаемость больных злокачественными опухолями яичников с учетом концентраций sPD-1 и sPD-L1

Для изучения связи sPD-1 в плазме крови с безрецидивной выживаемостью больных ЗОЯ, пациентки были разделены на подгруппы с учетом полученных концентраций по медиане и квартилям белка. Как следует из таблицы 55 и рисунка 24, полученные результаты послужили основанием для проведения дополнительного анализа с использованием в качестве порогового уровня sPD-1 50 мг/мл.

Таблица 55 – Безрецидивная выживаемость больных злокачественными опухолями яичников в зависимости от уровней sPD-1 в плазме крови

| Показатель sPD-1, пг/мл | N | Медиана срока рецидива (мес.) | Безрецидивная выживаемость (%) | | |
|-------------------------|----|-------------------------------|--------------------------------|-----------------|-----------------|
| | | | 1-летняя | 2-летняя | 3-летняя |
| <38 | 25 | Не опр. | $85,0 \pm 8,0$ | $75,0 \pm 9,7$ | $68,2 \pm 10,9$ |
| 38-49,9 | 22 | Не опр. | $83,3 \pm 8,8$ | $72,2 \pm 10,6$ | $72,2 \pm 10,6$ |
| 50-64,9 | 26 | 13,6 | $66,67 \pm 10,3$ | $38,1 \pm 10,6$ | $38,1 \pm 10,6$ |
| ≥ 65 | 20 | 17,4 | $68,8 \pm 11,6$ | $49,2 \pm 12,7$ | $30,8 \pm 13,1$ |

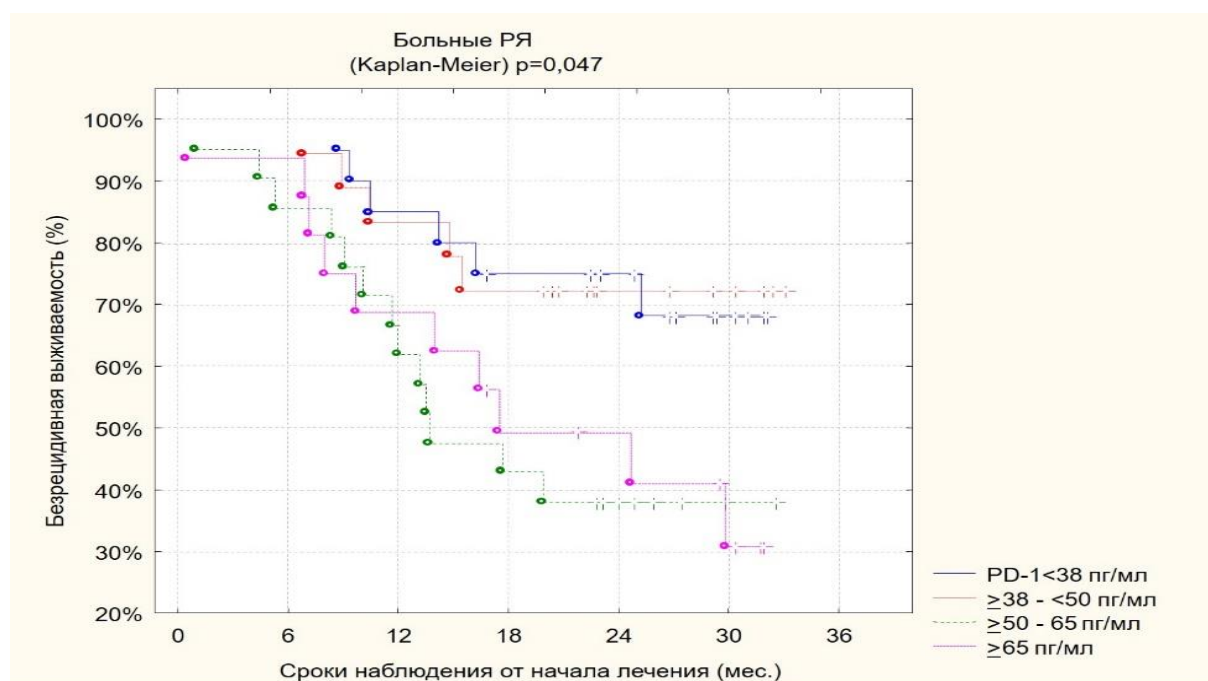


Рисунок 24 – Безрецидивная выживаемость при различных уровнях sPD-1 в плазме крови до лечения у больных злокачественными опухолями яичников

Наилучшее разделение больных ЗОЯ по безрецидивной выживаемости получено при пороговом значении sPD-1, равном его медиане (50 пг/мл) (Таблица 56; Рисунок 25). При этом 1-летняя безрецидивная выживаемость в группе больных ЗОЯ с концентрациями sPD-1 от 50 пг/мл и более значимо снижалась на 16,6%, 2-летняя - на 30,9% и 3-летняя - на 37,2%.

Таблица 56 – Безрецидивная выживаемость больных злокачественными опухолями яичников в группах с уровнями sPD-1 менее и более 50 пг/мл в плазме крови

| Показатель sPD-1, пг/мл | N | Медиана срока рецидива (мес.) | Безрецидивная выживаемость (%) | | |
|-------------------------------|----|--|--------------------------------|----------|----------|
| | | | 1-летняя | 2-летняя | 3-летняя |
| <50 | 47 | Не определ. | 84,2±5,9 | 73,7±7,1 | 69,6±7,8 |
| ≥50 | 46 | 17,0 | 67,6±11,6 | 42,8±8,2 | 32,4±9,1 |

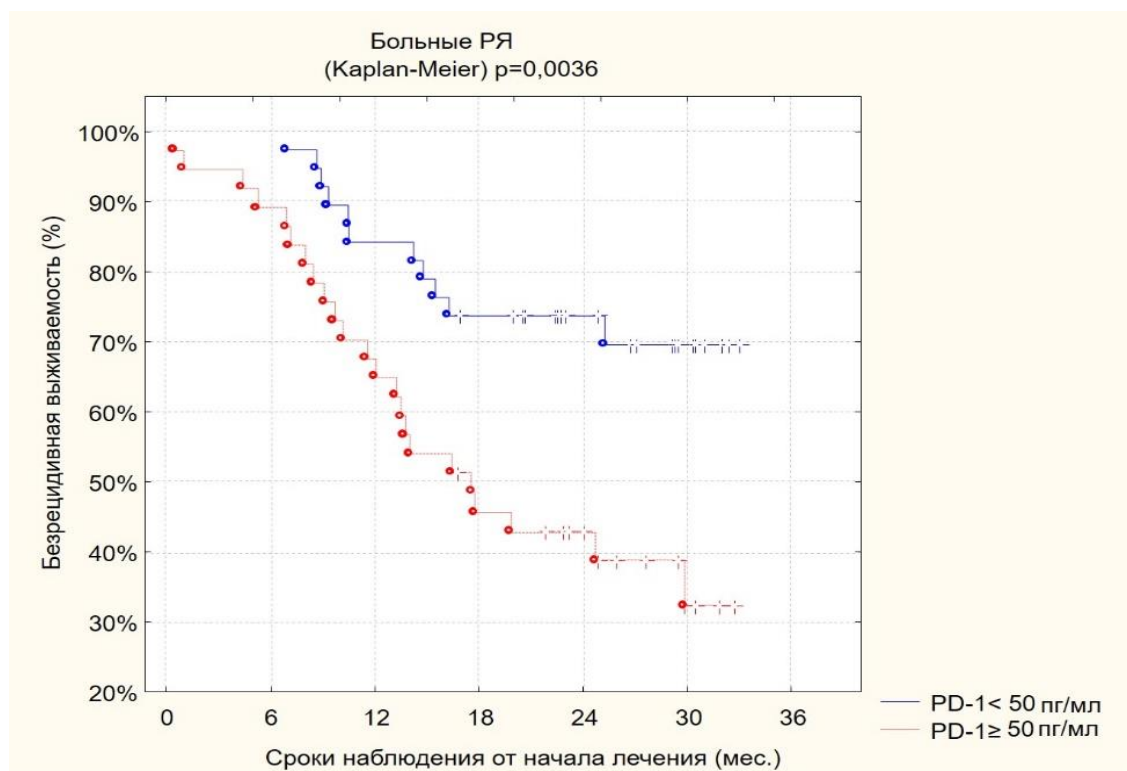


Рисунок 25 – Безрецидивная выживаемость больных злокачественными опухолями яичников при уровнях sPD-1 менее и более 50 пг/мл в плазме крови пациенток до лечения

Для изучения связи концентраций лиганда sPD-L1 с безрецидивной выживаемостью больных ЗОЯ, пациентки были разделены на подгруппы по его медиане и квартилям, в которых были рассчитаны показатели безрецидивной выживаемости (Таблица 57; Рисунок 26).

Таблица 57 – Безрецидивная выживаемость больных злокачественными опухолями яичников в зависимости от уровней sPD-L1 в плазме крови

| Показатель sPD-L1, пг/мл | N | Медиана срока рецидива (мес.) | Безрецидивная выживаемость (%) | | |
|--------------------------------|----|--|--------------------------------|----------|-----------|
| | | | 1-летняя | 2-летняя | 3-летняя |
| <22 | 25 | Не определ. | 89,5±7,0 | 78,3±9,6 | 62,6±16,0 |

| | | | | | |
|---------|----|-------------|-----------|-----------|-----------|
| 22-44,9 | 25 | Не определ. | 71,4±9,9 | 52,4±10,9 | 52,4±10,9 |
| 45-84,9 | 24 | 13,6 | 65,0±10,7 | 50,0±11,1 | 50,0±11,1 |
| ≥85 | 19 | 19,5 | 73,3±10,3 | 53,3±12,9 | 36,5±13,3 |

Как следует из таблицы 57, безрецидивная выживаемость была заметно выше в группе больных ЗОЯ при наиболее низких значениях sPD-L1 менее 22 пг/мл. В других подгруппах различия были слабо выражены, однако в подгруппе с наибольшими концентрациями sPD-L1 от 85 пг/мл и более медиана времени рецидива равнялась 19,5 мес., а 3-летняя безрецидивная выживаемость составила всего 36,5±13,3%. Она была почти в 2 раза хуже, чем при концентрациях sPD-L1 менее 22 пг/мл. Однако различия не были статистически значимыми.

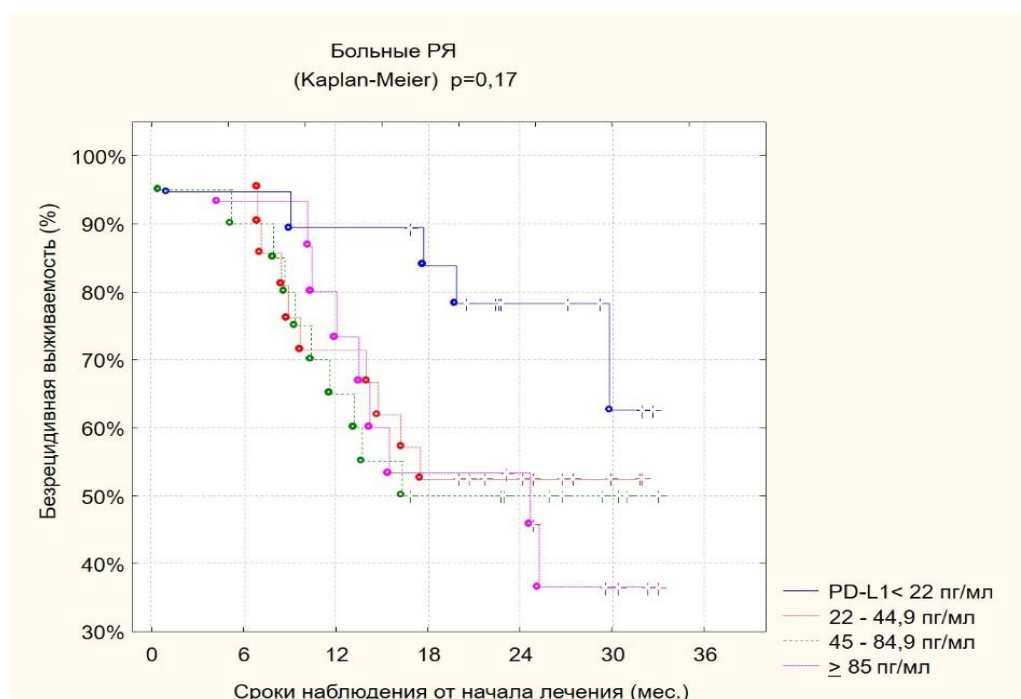


Рисунок 26 – Безрецидивная выживаемость больных злокачественными опухолями яичников при различных уровнях sPD-L1 в плазме крови пациенток до лечения

В то же время при выделении подгруппы с наименьшими концентрациями sPD-L1 в качестве порогового уровня были обнаружены статистически значимые различия в показателях безрецидивной выживаемости ($p=0,03$) (Таблица 58; Рисунок 27).

Таблица 58 – Безрецидивная выживаемость больных злокачественными опухолями яичников в зависимости от уровней sPD-L1 менее и более 22 пг/мл в плазме крови

| Показатель sPD-L1, пг/мл | N | Медиана срока рецидива (мес.) | Безрецидивная выживаемость (%) | | |
|--------------------------|----|-------------------------------|--------------------------------|----------|-----------|
| | | | 1-летняя | 2-летняя | 3-летняя |
| <22 | 25 | Не определ. | 89,5±7,0 | 78,3±9,6 | 62,6±16,0 |
| ≥22 | 68 | 22,5 | 71,4±6,0 | 51,7±6,7 | 46,5±7,0 |

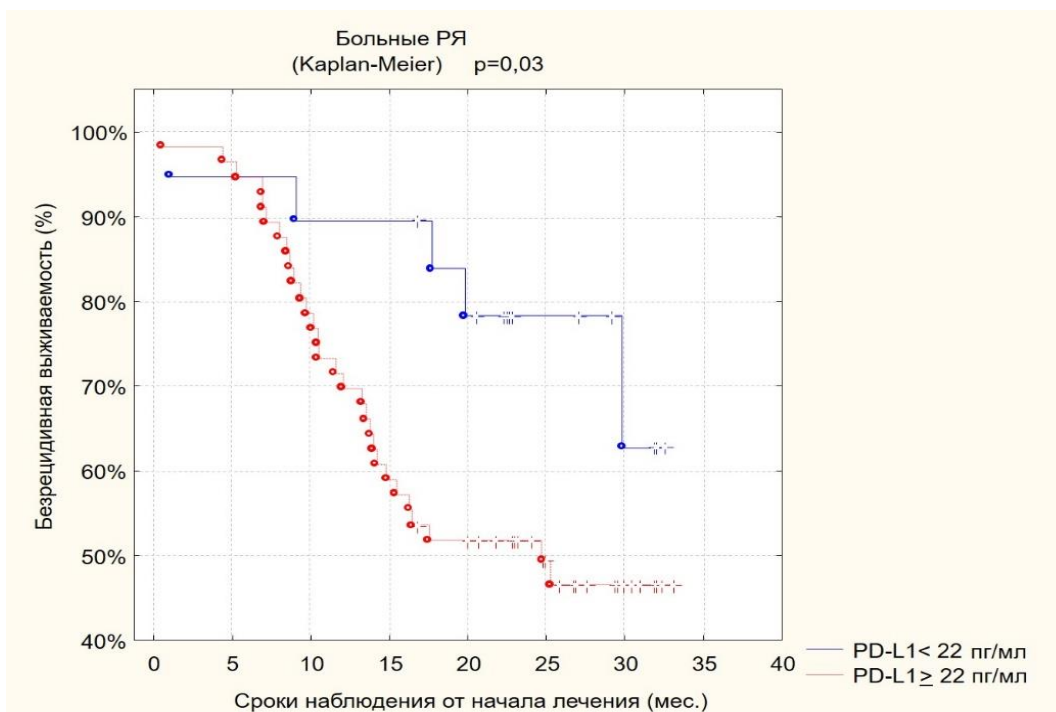


Рисунок 27 – Безрецидивная выживаемость больных злокачественными опухолями яичников при уровнях sPD-L1 менее и более 22 пг/мл в плазме крови пациенток до лечения

Как видно из данных таблицы 58, 1-летняя безрецидивная выживаемость при неблагоприятных концентрациях sPD-L1 от 22 пг/мл и более снижалась на 18%, 2-летняя - на 26,6%, 3-летняя - на 16,1%.

Таким образом, однофакторным анализом установлена статистически значимая связь показателей безрецидивной выживаемости с концентрациями sPD-1, sPD-L1 в плазме крови больных ЗОЯ до лечения.

При разделении больных ЗОЯ на подгруппы по медиане и квартилям соотношения sPD-1/sPD-L1 не отмечено статистически значимых различий в показателях безрецидивной выживаемости. Однако, наилучшая 3-летняя безрецидивная выживаемость выявлена в группе из пациенток с наибольшим соотношением sPD-1/sPD-L1 (более 2,6) и равнялась $57,0 \pm 13,7\%$, тогда как у пациенток при меньшем соотношении $47,2 \pm 7,2\%$ ($p=0,19$).

Многофакторный анализ с включением в модель обоих изучаемых показателей и основного определяющего фактора – стадии заболевания, показал, что уровни sPD-1 статистически значимо определяли безрецидивную выживаемость ($p=0,022$) наряду со стадией опухолевого процесса ($p=0,014$). При этом для sPD-L1 статистически значимой связи установлено не было. На основании полученных данных sPD-1 можно считать независимым фактором прогноза безрецидивной выживаемости у больных ЗОЯ (Таблица 59).

Таблица 59 – Результаты многофакторного анализа безрецидивной выживаемости больных злокачественными опухолями яичников

| Фактор | Beta | t-value | Wald Statistic | p |
|--------------------|-------------------|---------|----------------|-------|
| FIGO | $0,2204 \pm 0,09$ | 2,47 | 6,08 | 0,014 |
| sPD-1 50 пг/мл | $0,8552 \pm 0,37$ | 2,29 | 5,25 | 0,022 |
| sPD-L1 22 пг/мл | $0,4043 \pm 0,52$ | 0,78 | 0,61 | 0,44 |

Результаты многофакторного анализа позволяют сделать вывод о том, что определение концентрации sPD-1 в плазме крови больных ЗОЯ до начала лечения можно использовать для уточнения прогноза заболевания. Дополнительный анализ подтвердил достоверность данного вывода (Таблица 60; Рисунок 28).

Таблица 60 – Безрецидивная выживаемость больных злокачественными опухолями яичников в зависимости от стадии и уровней sPD-1 менее и более 50 пг/мл в плазме крови

| FIGO | Показатель sPD-1, пг/мл | Медиана срока рецидива (мес.) | Безрецидивная выживаемость (%) | | |
|-----------|-------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-----------|-----------|
| | | | 1-летняя | 2-летняя | 3-летняя |
| I | <50 | Не опред. | 100 | 100 | 100 |
| | ≥50 | Не опред. | 83,3±15,2 | 83,3±15,2 | 83,3±15,2 |
| II,IIIa,b | <50 | Не опред. | 88,9±10,5 | 66,7±15,7 | 66,7±15,7 |
| | ≥50 | 21,5 | 63,6±14,5 | 54,5±15,0 | 27,3±20,7 |
| IIIc,IV | <50 | 15,9 | 61,5±13,5 | 46,2±13,8 | 36,9±13,8 |
| | ≥50 | 13,5 | 60,0±11,0 | 25,0±9,7 | 20,0±8,9 |
| | p | | 0,049 | | |

Как видно из данных таблицы 60, при I стадии и концентрациях маркера sPD-1 менее 50 пг/мл все больные ЗОЯ были без рецидива заболевания на всем 3-летнем сроке наблюдения. Число пациенток с наиболее благоприятным прогнозом составило 20%. В то же время при высоких концентрациях sPD-1 3-летняя безрецидивная выживаемость снижалась до 83,3±15,2%.

В группе больных ЗОЯ с II и III a, b стадиями и низкими концентрациями sPD-1 показатель 3-летней безрецидивной выживаемости был заметно ниже и равнялся 66,7±15,7%. Однако при неблагоприятных концентрациях выше порогового уровня выживаемость снижалась до 27,3±20,7% с медианой срока выявления рецидива 21,5 мес.

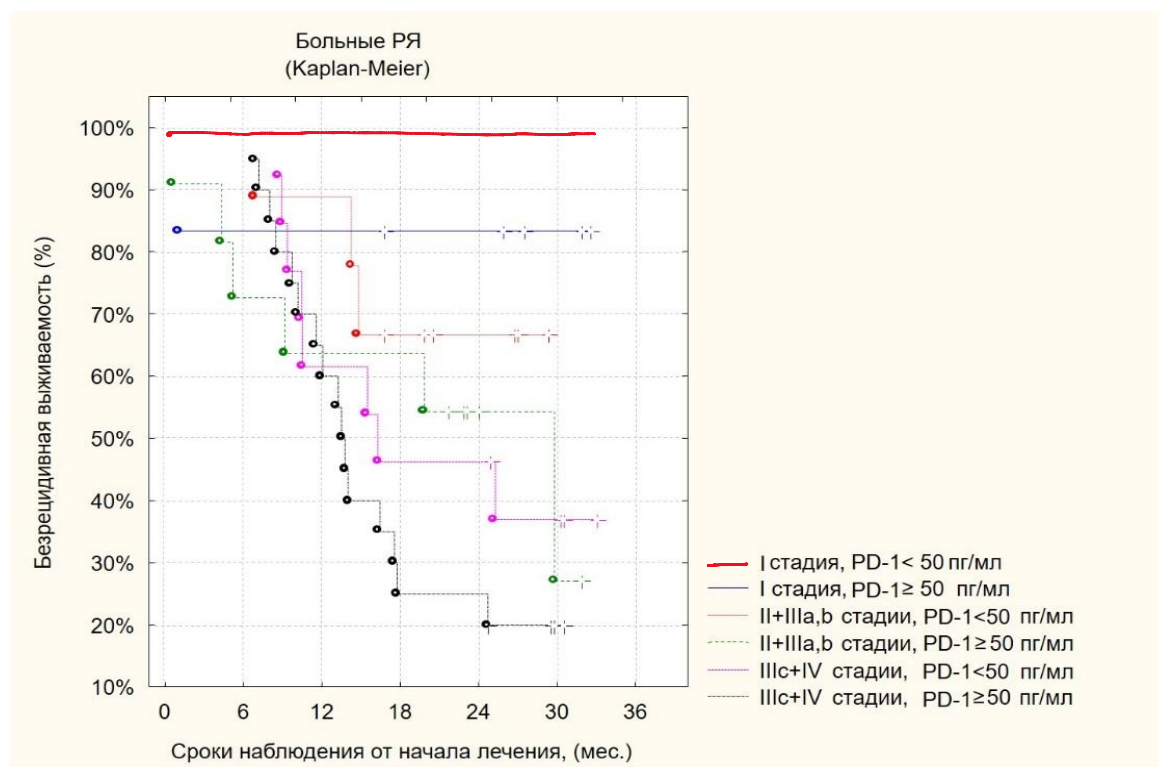


Рисунок 28 – Безрецидивная выживаемость больных раком яичников в зависимости от стадии и sPD-1 менее и более 50 пг/мл в плазме крови пациенток до лечения

В группе больных ЗОЯ с неблагоприятными IIIc и IV стадиями и низкими концентрациями sPD-1 3-летняя безрецидивная выживаемость была низкой и составила $36,9 \pm 13,8\%$ с медианой срока выявления рецидива 15,9 мес. В подгруппе пациенток с неблагоприятными высокими показателями белка 3-летняя выживаемость снижалась до наименьшего значения $20,0 \pm 8,9\%$ с медианой времени выявления рецидива 13,5 мес. Число больных ЗОЯ с наиболее неблагоприятным прогнозом заболевания составило 26,7%.

Больные ЗОЯ также были разделены на подгруппы, ориентируясь на медианы и квартили, соотношения sPD-1/sPD-L1 в плазме крови.

Таким образом, однофакторным анализом показано, что базальные уровни sPD-1 и sPD-L1 являются статистически значимыми факторами прогноза безрецидивной выживаемости у больных раком яичников. При многофакторном анализе дополнительно к стадиям по FIGO уровень sPD-1 был связан с безрецидивной выживаемостью больных, что подтверждает его значимость, как

фактора прогноза течения заболевания.

5.3. Связь уровней метилирования маркеров микроРНК с показателями безрецидивной выживаемости у больных злокачественными опухолями яичников

Больные ЗОЯ были разделены на подгруппы, ориентируясь на медианы и квартили метилирования 14 генов микроРНК. В подгруппах рассчитывали показатели безрецидивной выживаемости и их различие. Обнаружены статистически значимые различия безрецидивной выживаемости с разным уровнем метилирования для 3-х генов микроРНК *MIR-124a-2*, *MIR-34b*, *MIR-9-1* (Таблица 61). Для этих маркеров при «низких» (менее меньшей квартили) уровнях метилирования, приближающихся к таковым в неизменной ткани яичника, выявлены существенно лучшие показатели безрецидивной выживаемости больных РЯ.

Таблица 61 – Безрецидивная выживаемость больных раком яичников в зависимости от уровней метилирования некоторых микроРНК

| Маркер | Уровни метилирования (%) | N | Медиана срока рецидива (мес.) | Безрецидивная выживаемость (%) | | |
|---|--------------------------|----|-------------------------------|--------------------------------|-----------|-----------|
| | | | | 1-летняя | 2-летняя | 3-летняя |
| <i>MIR-124a-2</i> | <30 | 7 | Не опр. | 71,4±17,1 | 71,4±17,1 | 71,4±17,1 |
| | ≥30 | 19 | 12,4 | 52,6±11,5 | 31,6±10,7 | 25,3±10,2 |
| Log-Rank Test p=0,11; Cox'Test p=0,024 | | | | | | |

| | | | | | | |
|----------------|--|----|---------|-----------|-----------|-----------|
| <i>MIR-9-1</i> | <9 | 8 | Не опр. | 75,0±15,3 | 75,0±15,3 | 75,0±15,3 |
| | ≥9 | 18 | 11,6 | 50,0±11,8 | 27,8±10,6 | 20,8±9,9 |
| | Log-Rank Test p=0,039; Cox' Test p=0,0075 | | | | | |

Так, 3-летняя безрецидивная выживаемость 8 больных ЗОЯ с уровнями метилирования гена *MIR-9-1* менее 9% равнялась 75,0±15,3%, но снижалась при высоких уровнях метилирования на 55% до 20,8±9,9%, медиана времени выявления метастазов либо продолженного роста опухоли составила всего 11,6 мес. (Рисунок 29).

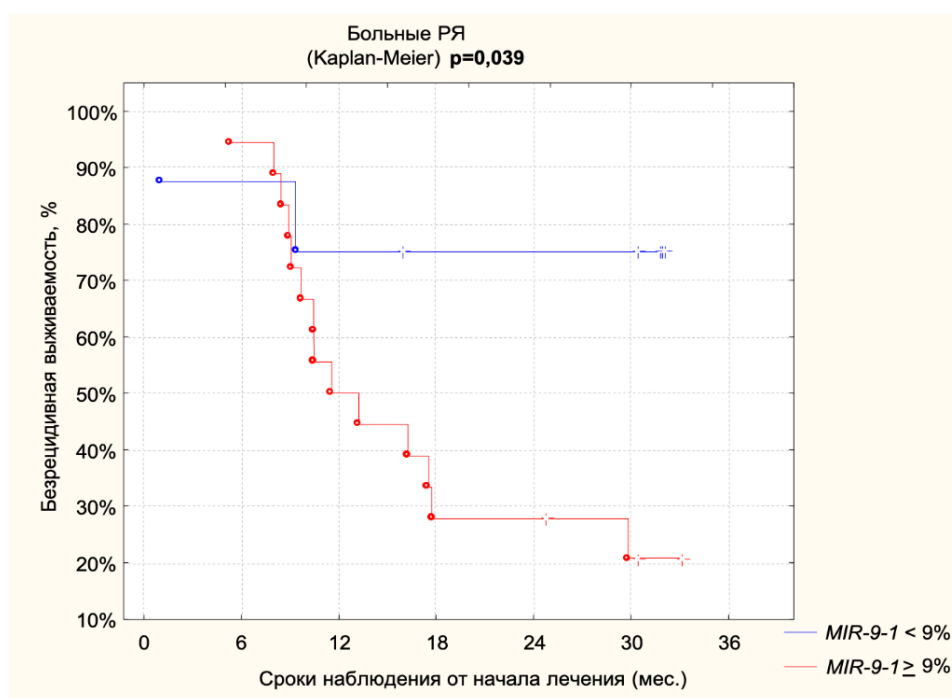


Рисунок 29 – Безрецидивная выживаемость больных злокачественными опухолями яичников в зависимости от уровня метилирования гена *MIR-9-1*, равного 9%

Показатель 3-летней безрецидивной выживаемости 7 больных ЗОЯ с уровнями метилирования *MIR-124a-2* был менее 30%, и равнялся 71,4±17,1%, но

снижался при высоких уровнях метилирования на 55% до $25,3 \pm 10,2\%$, медиана срока выявления метастазов либо продолженного роста опухоли составила всего 12,4 мес. (Рисунок 30).

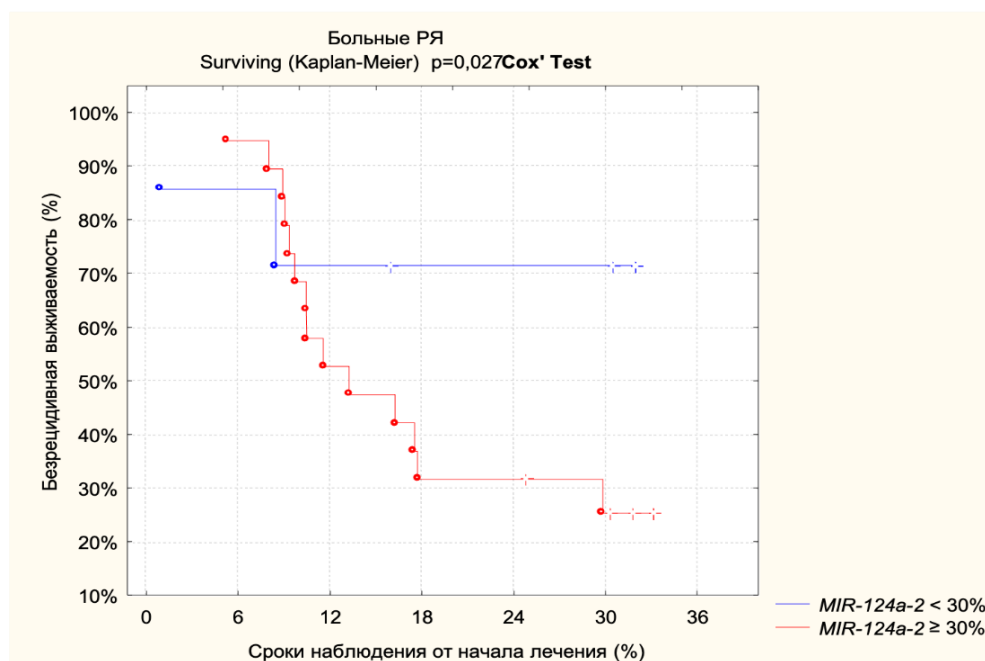


Рисунок 30 – Безрецидивная выживаемость больных злокачественными опухолями яичников в зависимости от уровня метилирования гена *MIR-124a-2*, равного 30%

В то же время, при многофакторном анализе с включением в модель уровней метилирования гена *MIR-9-1* и стадии опухолевого процесса, только стадия высокозначимо определяла отдаленные результаты лечения больных ЗОЯ ($p < 0,0001$), тогда как уровни метилирования гена *MIR-9-1* слабо определяли безрецидивную выживаемость ($p = 0,44$). Так, из 8 больных ЗОЯ с «низкими» уровнями метилирования гена *MIR-9-1* 5 (62,5%) были с Ic-стадией заболевания, 1 (12,5%) - с Ib стадией и 2 (25%) - с III стадией (у 1 больной выявлен рецидив через 9 мес после начала лечения, еще 1 больная была без рецидива 30 мес). Напротив, из 18 больных ЗОЯ с «высокими» уровнями метилирования гена *MIR-9-1* $\geq 9\%$ у 16 (88,9%) пациенток была III либо IV стадия, и только у 2-х (11,1%) – II стадия. Выживаемость в этих подгруппах не рассчитывали из-за небольшого

числа наблюдений.

Аналогичные результаты получены и для уровней метилирования генов *MIR-124a-2* и *MIR-34b*.

Следует отметить, что из 12 больных ЗОЯ с прогностически благоприятными концентрациями sPD-1 в плазме крови (менее 50 пг/мл) у 5 (41,7%) были также выявлены благоприятные уровни метилирования гена *MIR-9-1* (менее 9%). И, напротив, в группе из 13 больных с прогностически неблагоприятными концентрациями sPD-1 (от 50 и более пг/мл) только у 2-х (15,4%) были выявлены благоприятные «низкие» уровни метилирования гена *MIR-9-1* ($p=0,14$) (Рисунок 31).

При этом 3-летняя безрецидивная выживаемость в группе из 5 больных ЗОЯ при одновременно благоприятных прогностических значениях sPD-1 и уровня метилирования гена *MIR-9-1* составила $80,0\pm 17,9\%$, тогда как в группе из 7 больных с неблагоприятными уровнями метилирования *MIR-9-1* (от 9% и более) снижалась до $42,9\pm 18,7\%$ с медианой срока выявления рецидива до 13,4 мес.

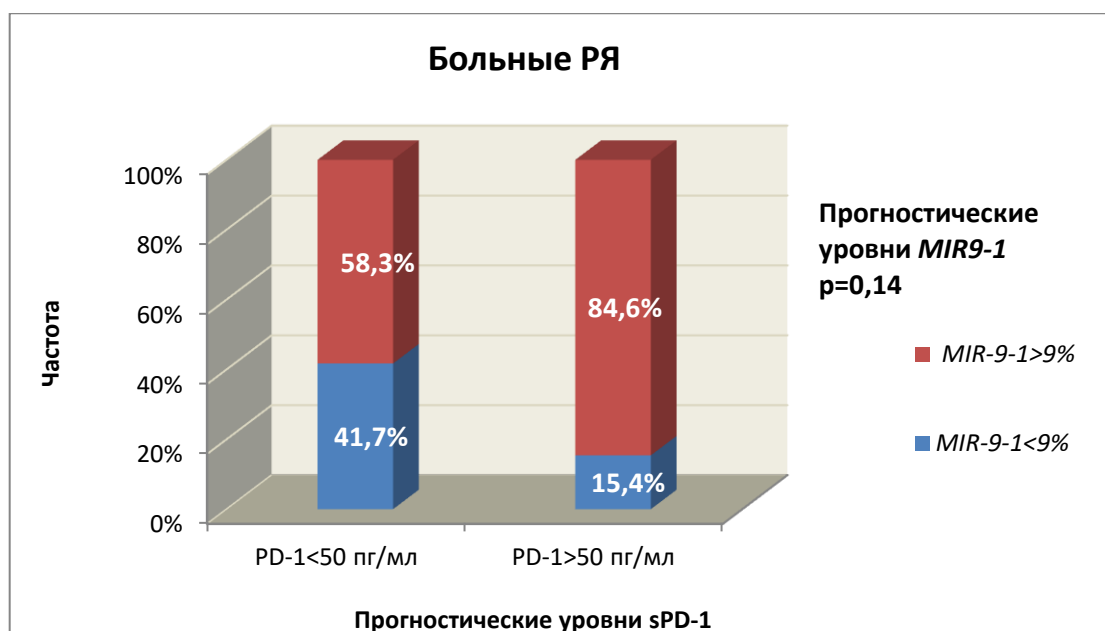


Рисунок 31 – Взаимосвязь частоты выявления прогностических уровней sPD-1 и уровней метилирования гена *MIR-9-1* у больных злокачественными опухолями яичников

В группе из 11 больных ЗОЯ с одновременно неблагоприятными прогностическими уровнями как sPD-1, так и уровнями метилирования гена *MIR-9-1* у всех пациенток выявлен рецидив на 3-м году наблюдения с медианой срока обнаружения рецидива равной 10,6 мес ($p=0,19$; Рисунок 32).

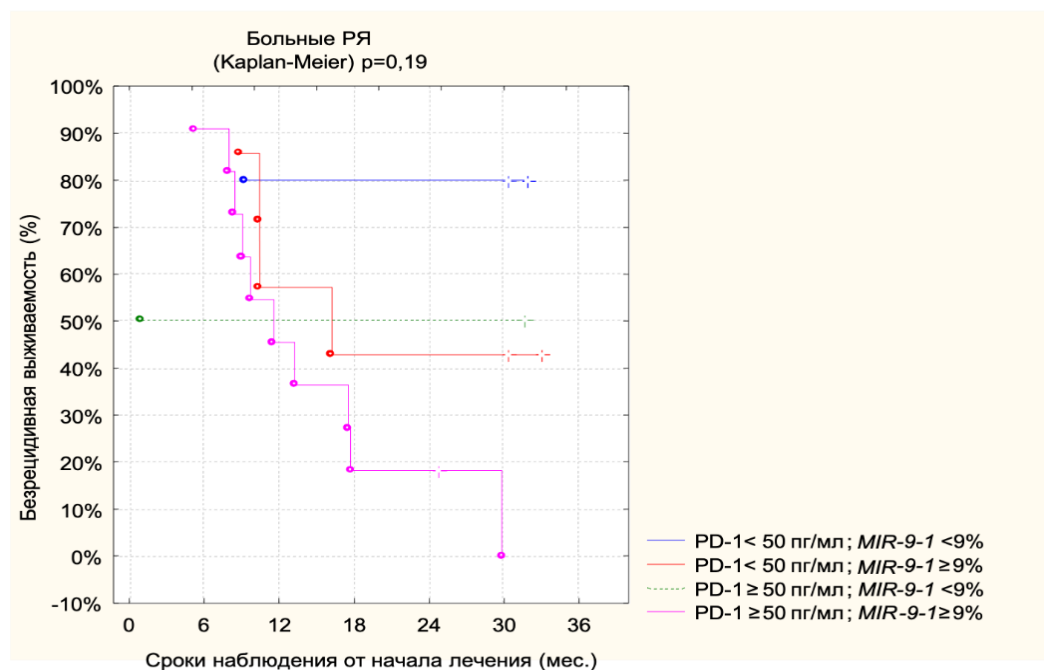


Рисунок 32 – Безрецидивная выживаемость больных раком яичников в зависимости от концентраций sPD-1 менее и более 50 пг/мл и уровня метилирования гена *MIR-9-1* менее и более 9%

Для расчета безрецидивной выживаемости больных РЯ с различной экспрессией генов микроРНК пациентки были разделены на 2 группы по медиане экспрессии каждого гена. Экспрессия 2-х генов микроРНК показала тенденцию к различию безрецидивной выживаемости (*MIR-132* и *MIR-137*), различия для экспрессии гена микроРНК *MIR-9-1* были статистически значимыми, однако следует отметить небольшое количество наблюдений (Таблица 62). Лучшая безрецидивная выживаемость отмечена у больных РЯ при «высоких» уровнях экспрессии гена микроРНК *MIR-9-1* и, напротив, при «низких» уровнях экспрессии генов микроРНК *MIR-132* и *MIR-137*. При этом, из 8 пациенток с уровнями экспрессии микроРНК более -1,7 только у 1 больной развился рецидив

на сроке 29,8 месяцев, тогда как у 7 из 8 пациенток в группе с уровнями экспрессии микроРНК от -1,7 и менее, напротив, был выявлен рецидив в сроки от 5,3 по 11,6 месяцев (Рисунок 33).

Таблица 62 – Безрецидивная выживаемость больных раком яичников в группах с различными уровнями экспрессии некоторых генов микроРНК

| Ген микроРНК | Медиана | Безрецидивная выживаемость (%) | | | | p | |
|----------------|---------|--------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|
| | | 6 мес. | 1 год | 2 года | 3 года | | |
| <i>MIR-132</i> | >-2,1 | 8,9 мес. | 87,5±11,7 | 37,5±17,1 | 37,5±17,1 | 18,8±15,8 | 0,059 |
| | ≤-2,1 | Не дост. | 87,5±11,7 | 75,0±15,3 | 75,0±15,3 | 75,0±15,3 | |
| <i>MIR-9-1</i> | >-1,7 | Не дост. | 100 | 100 | 100 | 83,3±15,2 | 0,002 |
| | ≤-1,7 | 8,5 мес. | 75,0±15,3 | 12,5±11,7 | 12,5±11,7 | - | |
| <i>MIR-137</i> | >-1,4 | 10,5 мес. | 87,5±11,7 | 37,5±17,1 | 37,5±17,1 | 18,8±15,8 | 0,1 |
| | ≤-1,4 | Не дост. | 87,5±11,7 | 75,0±15,3 | 75,0±15,3 | 75,0±15,3 | |

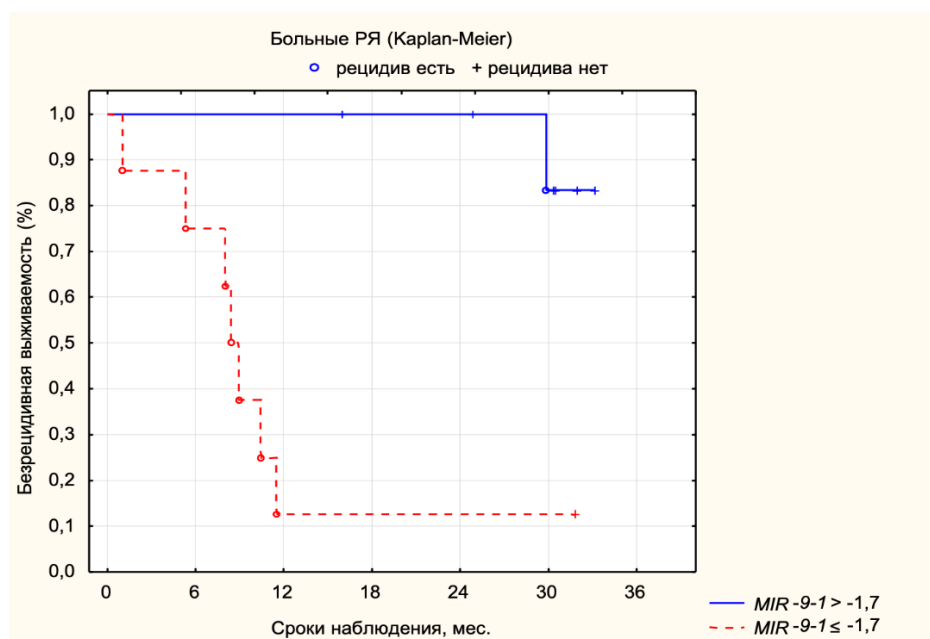


Рисунок 33 – Безрецидивная выживаемость больных раком яичников в группах с различными уровнями экспрессии гена микроРНК *MIR-9-1*

Таким образом, подводя итоги данного раздела исследования следует отметить:

- 3-летняя безрецидивная выживаемость больных ЗОЯ равнялась $54,2 \pm 6,4\%$, медиана срока выявления рецидива заболевания не была достигнута на 3-летнем периоде наблюдения;
- при однофакторном анализе обнаружено, что безрецидивную выживаемость больных ЗОЯ статистически значимо определяли такие клинические факторы как стадия заболевания (снижение на 77,6%), степень дифференцировки опухоли (снижение на 64%), наличие метастазов в большом сальнике (снижение на 59%), диссеминации по брюшине (снижение на 50,9%), наличие асцита (снижение на 26,8%), уровни HE-4 (снижение на 70,2%);
- факторы анамнеза больных ЗОЯ не определяли сроки развития рецидива;
- статистически значимо худшая безрецидивная выживаемость отмечена при не оптимальной операции (снижение на 53,3%);
- концентрации sPD-1 в плазме крови более 50 пг/мл статистически значимо снижали безрецидивную выживаемость больных ЗОЯ (на 37,2%);
- концентрации sPD-L1 в плазме крови более 22 пг/мл статистически значимо снижали безрецидивную выживаемость больных ЗОЯ (на 16,1%);
- уровни метилирования микроРНК *MIR-9-1* (снижение на 54,2%), микроРНК *MIR-124a-2* (снижение на 46,1%) статистически значимо снижали безрецидивную выживаемость больных ЗОЯ.
- Многофакторный анализ показал, что статистически значимо определяли безрецидивную выживаемость больных ЗОЯ только стадия заболевания и концентрации маркера sPD-1, которые можно считать независимыми факторами прогноза при раке яичников.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рак яичников является агрессивной опухолью женской репродуктивной системы. По данным статистики, в 2018 было выявлено более 14000 новых случаев РЯ, при этом более 8000 женщин погибли за год [3]. Более 70% случаев РЯ диагностируется на III-IV стадии из-за отсутствия патогномоничных симптомов заболевания, эффективных скрининговых программ, высокоспецифичных и чувствительных методик диагностики начальных стадий, отсутствия маркеров для ранней диагностики [13, 23].

Кроме того, злокачественные новообразования яичников занимают одно из первых мест по разнообразию развивающихся в нем опухолей. Так, среди эпителиальных злокачественных новообразований чаще встречаются серозные опухоли [93].

Несмотря на неудовлетворительные результаты применения скрининговых программ, сохраняется необходимость изучения и внедрения эффективных методов ранней диагностики, а также большой интерес исследователей и практических врачей обращен к поиску биологических маркеров заболевания, дифференциальной диагностики и оценке прогноза рака яичников.

В конце XX века произошло открытие таких важных компонентов иммунной системы, как контрольные точки иммунитета, одна из которых PD-1/PD-L1, активируя и ингибируя апоптоз антиген-специфичных Т-лимфоцитов и супрессорных Т-клеток соответственно, создает защитный механизм опухолевых клеток от воздействия иммунной системы организма. Так, экспрессируемый PD-L1, например, участвует в защите периферических тканей от чрезмерного воспаления и аутоиммунных патологий [46]. Лекарственные препараты, подавляющие работу PD-1/PD-L1, активно применяются при лечении ряда онкологических заболеваний, например, НМРЛ, меланомы [26, 120, 168, 190].

В обычных условиях PD-1 взаимодействует со своими лигандами, PD-L1 и PD-L2, играя значимую роль в супрессии иммунной системы, посредством

подавления функции Т-клеток и активизируя регуляторные Т клетки, а следовательно снижает иммунитет [76, 79].

Поиск механизмов, оказывающих влияние на содержание PD-1/PD-L1 в опухолях, остается актуальным в настоящее время. Так, важное значение в ингибировании экспрессии генов, регулирующих PD-L1, могут играть микроРНК. Имеются данные о корреляции между метилированием и снижением уровня экспрессии генов микроРНК [29, 111].

Настоящее исследование посвящено изучению клинической значимости метилирования и экспрессии группы генов микроРНК и их ассоциации с растворимыми формами рецептора программируемой гибели клетки sPD-1 и его лиганда sPD-L1 в целях повышения эффективности диагностики и оценки прогноза рака яичников.

В проведенном нами исследовании получено, что уровень метилирования исследованных генов микроРНК *MIR-124a-2*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339* в образцах опухолях больных РЯ находится в положительной корреляции с содержанием sPD-L1 в плазме крови. В соответствии с данными о сильной отрицательной корреляции метилирования с экспрессией генов этих микроРНК при РЯ [118] логично предположить, что уровни этих микроРНК, напротив, находятся в обратной зависимости с содержанием sPD-L1 в плазме крови этих больных. Таким образом, кодируемые этими генами микроРНК *MIR-124a-2*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339* – могут быть ингибиторами лиганда контрольной точки иммунитета PD-L1 [203].

Кроме того, в исследованных образцах опухолей РЯ нами выявлена значимая корреляция между высокими уровнями метилирования гена *MIR-9-1* и, на уровне тенденции, гена *MIR-124a-2* и низкой безрецидивной выживаемостью больных. Таким образом, высокие уровни метилирования гена *MIR-9-1* и, предположительно, *MIR-124a-2* в опухолях РЯ могут служить самостоятельными прогностическими маркерами неблагоприятного исхода и низкой безрецидивной выживаемости больных РЯ. Эти результаты, безусловно, требуют подтверждения

на большой выборке больных, но следует учитывать, что это первые данные по выявлению роли метилирования генов микроРНК как маркеров выживаемости при РЯ.

В целом, полученные нами данные – свидетельство важной роли метилирования генов регуляторных онкосупрессорных микроРНК в опухолях больных РЯ. Гиперметилирование подавляет их экспрессию, а значит и ингибирование их проопухолевых генов-мишеней. Так, нами показано, что повышенное метилирование генов микроРНК: *MIR-124a-2*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3* и *MIR-339* коррелирует с усилением экспрессии лиганда контрольной точки иммунитета – PD-L1, что может быть связано со снижением экспрессии этих микроРНК. Кроме того, нами обнаружено, что высокий уровень метилирования генов *MIR-124a-2* и *MIR-9-1*, кодирующих важные онкосупрессорные микроРНК, ассоциирован с низкой безрецидивной выживаемостью больных РЯ.

На основании анализа полученных нами результатов у больных РЯ выявлено повышение уровня метилирования 11 из 14 генов микроРНК в первичной опухоли; показана ассоциация гиперметилирования генов *MIR-124a-2*, *MIR-125b-1*, *MIR-127* с развитием РЯ; дальнейшее повышение уровня метилирования в метастазах больных РЯ выявлено наиболее часто для генов микроРНК *MIR-339* и *MIR-203a*. Показана согласованность между процессами метилирования для попарных сочетаний генов микроРНК как в опухолях, так и в метастазах; в опухолях значимые корреляции отмечены для 29 пар генов микроРНК, а в метастазах – для 14 пар микроРНК; высоко значимые корреляции ($r_s > 0,7$; $p < 0,0001$) в опухолях выявлены для 3 пар генов микроРНК (*MIR-34b* и *MIR-34c*; *MIR-129-2* и *MIR-132*; *MIR-124a-2* и *MIR-127*), а в метастазах – для 4 пар (*MIR-34b* и *MIR-34c*; *MIR-9-1* и *MIR-34b*; *MIR-34c* и *MIR-9-1*; *MIR-129-2* и *MIR-132*). Кроме того, показана связь метилирования генов микроРНК в опухолях больных РЯ с клиническими факторами заболевания: 9 генов (*MIR-124a-2*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-34b*, *MIR-34c*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*) – со стадией; 6 генов (*MIR-124a-2*, *MIR-129-2*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*) – с

наличием метастазов в большом сальнике; гена *MIR-132* – с диссеминацией по брюшине; гена *MIR-375* – со снижением степени дифференцировки новообразования.

Для 12 исследованных микроРНК установлено снижение уровней экспрессии в опухолях относительно прилежащих норм, что соответствует гиперметилированию их генов и подтверждает функциональную роль метилирования в подавлении экспрессии этих генов микроРНК.

Выявлена позитивная корреляция между уровнями экспрессии в опухолях РЯ для попарных сочетаний генов *MIR-129 & MIR-125b-1*, *MIR-132 & MIR-203a* и *MIR-9-1 & MIR-339* ($rs=0,51-0,64$; $p<0,05$), показывающая сопряженность между экспрессией микроРНК в этих парах.

Показано дальнейшее снижение экспрессии некоторых генов микроРНК по мере прогрессии заболевания. Установлена значимая связь снижения уровней экспрессии генов микроРНК в опухолях со снижением степени дифференцировки для гена *MIR-127* ($p=0,07$), с наличием метастазов в большом сальнике – для гена *MIR-339* ($p<0,05$), с диссеминацией опухоли по брюшине – для гена *MIR-127* ($p<0,05$). Таким образом, подавление экспрессии гиперметилируемых опухолевых супрессорных микроРНК ассоциировано с некоторыми характеристиками прогрессии заболевания.

Снижение уровня экспрессии гена *MIR-339* в опухолях значимо ($p=0,035$) ассоциировано со снижением уровня sPD-1 в плазме крови, что подтверждает возможную вовлеченность некоторых микроРНК в регуляцию контрольных точек иммунитета.

По данным литературы, в одной из опубликованных работ о значении сигнальной системы PD-1/PD-L1 отмечено повышение экспрессии PD-L1 при диссеминированных стадиях в серьезных аденокарциномах высокой степени злокачественности [68].

Эти данные совпали с опеределенными закономерностями, полученными в плазме крови в нашей работе для sPD-L1. Ряд авторов, изучавших в плазме крови

sPD-L1, не проанализировали свои результаты с клинико-морфологическими характеристиками, а также прогнозом заболевания, однако было получено статистически значимое повышение уровня маркера у пациенток с верифицированным раком яичников по отношению к женщинам с доброкачественным образованиями яичников и группе контроля [49]. Вероятно, данные различия объясняются применением других методов иммуноферментного анализа. На диссеминированных стадиях злокачественных новообразований, по данным литературы отмечали повышение уровня sPD-L1 у пациентов с почечно-клеточным раком, раком желудка и печени, немелкоклеточным раком легкого [14, 202].

На основании анализа полученных результатов было установлено, что sPD-1 и sPD-L1 не были связаны с гистологическим типом РЯ и степенью дифференцировки. Медианы sPD-L1 в плазме крови пациенток РЯ с наличием и отсутствием асцита имели достоверные различия (71,9 и 23,7 пг/мл соответственно; $p < 0,0001$). Уровни sPD-L1 статистически значимо выше у пациенток при наличии опухолевых клеток в смывах (82,0 пг/мл), чем у больных без опухолевого выпота (42,0 пг/мл, $p = 0,04$). При многофакторном анализе было установлено, что уровни sPD-L1 в плазме крови больных РЯ связана с размером первичной опухоли ($p = 0,01$), наличием асцита ($p = 0,012$) и отдаленных метастазов ($p = 0,042$). Высокие показатели sPD-1 обнаружены в плазме крови больных РЯ с критерием Т3 относительно критерия Т1 ($p < 0,046$). Полученные данные свидетельствуют о том, что концентрации sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных РЯ отражают распространенность опухолевого процесса.

Анализ результатов лечения больных раком яичников показал связь установленных пороговых значений sPD-1 и sPD-L1 с показателями безрецидивной выживаемости. При этом высокие исходные уровни маркеров sPD-1 в плазме крови более 50 пг/мл были статистически значимыми, независимыми неблагоприятными факторами прогноза безрецидивной выживаемости у больных раком яичников. Дальнейшие исследования

растворимых форм sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови позволят установить и их связь с уровнями метилирования и экспрессии генов микроРНК, а также определить их значимость в практической клинической онкологической работе и для рутинного использования в диагностике и оценке прогноза РЯ.

ВЫВОДЫ

1. Концентрации рецептора sPD-1 в плазме крови здоровых женщин статистически значимо ниже, чем у больных ДОЯ, и не отличались от больных РЯ. Различия в уровнях sPD-1 между больными ДОЯ и РЯ не значимы. При этом уровни sPD-1 у больных РЯ не связаны с данными анамнеза, гистологическим строением опухоли, наличием опухолевых клеток в смывах из брюшной полости, уровнями маркеров СА-125 и НЕ-4, не зависели от объема асцита, но было статистически значимо выше при наличии диссеминатов опухоли по брюшине размером более 1 см. Многофакторный анализ показал, что стадия заболевания и уровни sPD-1 следует считать независимыми факторами прогноза при РЯ.

2. Концентрации sPD-L1 в плазме крови больных ДОЯ статистически значимо ниже, чем в контроле, не различались в ПОЯ и ДОЯ, а при РЯ не отличались от контроля и достоверно выше, чем ДОЯ; не связаны с данными анамнеза и гистологическим строением опухоли, но значимо отражали стадию, критерии N и M. При этом, уровни sPD-L1 не различались в группах больных РЯ с отсутствием и наличием диссеминатов по брюшине размером более 1,0 см, достоверно выше при наличии асцита и опухолевых клеток в смывах из брюшной полости, связаны прямой корреляционной зависимостью с уровнями маркеров СА-125 и НЕ-4, но не с концентрациями sPD-1.

3. У больных РЯ выявлено повышение уровня метилирования 11 из 14 генов микроРНК в первичной опухоли; показана ассоциация гиперметилирования генов *MIR-124a-2*, *MIR-125b-1*, *MIR-127* с развитием РЯ; дальнейшее повышение уровня метилирования отмечено в метастазах РЯ для генов микроРНК *MIR-339* и *MIR-203a*. При этом, показана согласованность между процессами метилирования для 29 пар генов микроРНК в опухолях и для 14 пар генов микроРНК в метастазах РЯ; в опухолях значимые корреляции отмечены для 29 пар генов микроРНК, а в метастазах – для 14 пар микроРНК; высоко значимые корреляции в опухолях выявлены для 3 пар генов микроРНК (*MIR-34b* и *MIR-34c*; *MIR-129-2* и *MIR-132*;

MIR-124a-2 и *MIR-127*), в метастазах – для 4 пар (*MIR-34b* и *MIR-34c*; *MIR-9-1* и *MIR-34b*; *MIR-34c* и *MIR-9-1*; *MIR-129-2* и *MIR-132*).

4. Показана связь метилирования генов микроРНК в опухолях больных РЯ с клиническими факторами заболевания: для 9 генов (*MIR-124a-2*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-34b*, *MIR-34c*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*) – со стадией; для 6 генов (*MIR-124a-2*, *MIR-129-2*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*) – с наличием метастазов в большом сальнике; гена *MIR-132* – с диссеминацией по брюшине; гена *MIR375* – со снижением степени дифференцировки новообразования.

5. Уровни метилирования генов *MIR-124a-2*, *MIR-34b*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339* в опухоли связаны значимой линейной зависимостью с концентрациями sPD-L1 в плазме крови больных РЯ, наиболее тесной с *MIR-124a-2*. Связь концентраций sPD-L1 с уровнем метилирования изучаемых генов микроРНК в метастазах отсутствовала. Уровни метилирования генов *MIR-124a-2* и *MIR-34b* в опухоли больных РЯ статистически значимо различались у пациенток с концентрациями sPD-L1 менее и более 60 пг/мл в плазме крови.

6. Установлено снижение экспрессии 12 генов микроРНК (*MIR-124a-2*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-132*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-125b-1*, *MIR-137*, *MIR-203a*, *MIR-375*, *MIR-34b*, *MIR-339*) в опухолях больных РЯ относительно нормальной ткани яичников, что соответствует гиперметилированию их генов и подтверждает функциональную роль метилирования в подавлении экспрессии этих генов микроРНК. При этом подавление экспрессии гиперметилируемых опухолевых супрессорных микроРНК ассоциировано с некоторыми характеристиками прогрессии РЯ: снижением степени его дифференцировки (ген *MIR-127*), при выявлении асцита (ген *MIR-34b*) и диссеминации опухоли по брюшине (ген *MIR-127*). При этом, статистически значимое снижение уровня экспрессии гена *MIR-339* в опухолях ассоциировано со снижением уровня sPD-1 в плазме крови, что подтверждает возможную вовлеченность некоторых микроРНК в регуляцию контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1.

7. Концентрации sPD-1 в плазме крови ≥ 50 пг/мл, sPD-L1 ≥ 22 пг/мл, повышенные уровни метилирования генов *MIR-9-1* ($>9\%$), *MIR-124a-2* ($>30\%$), и сниженный уровень экспрессии *MIR-9-1* ($\leq 1,7$) опухоли статистически значимо связаны с низкими показателями безрецидивной 3-летней выживаемости больных РЯ.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Врачам онкологам, гинекологам, клинической лабораторной диагностики, работающим в специализированных онкологических стационарах, рекомендуется:

1. В качестве дополнительных лабораторных маркеров оценки прогноза безрецидивной выживаемости больных раком яичников исследовать в плазме крови иммуноферментным методом исходные уровни растворимых форм контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 – рецептора программируемой гибели клетки sPD-1 и его лиганда sPD-L1, для выявления группы риска. Значимыми факторами неблагоприятного прогноза 3-летней безрецидивной выживаемости больных раком яичников следует считать концентрации sPD-1 в плазме крови более 50 пг/мл, а sPD-L1 более 22 пг/мл.

2. Исследовать до начала лечения уровни метилирования генов микроРНК *MIR-9-1*, *MIR-124a-2* в ткани опухоли с помощью метода количественной метилспецифичной ПЦР с детекцией в реальном времени, так как повышенные уровни этих маркеров являются независимыми и статистически значимо связанными факторами с низкими показателями 3-летней безрецидивной выживаемости больных раком яичников.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ДОЯ – доброкачественные опухоли яичников
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ЗОЯ – злокачественные опухоли яичников
- ИМ – индекс метилирования
- НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого
- ОТ-ПЦР - полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
- ПОЯ – пограничные опухоли яичников
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РМЖ – рак молочной железы
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- РЯ – рак яичников
- УЗИ – ультразвуковое исследование
- микроРНК – малые некодирующие рибонуклеиновые кислоты
- BRCA – ген рака молочной железы
- CA-125 – углеводный антиген 125
- САР – цисплатин, доксорубицин, паклитаксел
- СрG-островки – последовательности пар нуклеотидов
- FDA - Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств
- FIGO – международная федерация акушеров-гинекологов
- HE-4 – белок 4 эпидидимиса
- HGSC - серозная карцинома высокой степени злокачественности
- LGSC – серозная карцинома низкой степени злокачественности
- PARP – ингибиторы фермента поли (АДФ-рибоза) полимеразы
- PD-1 – белок запрограммированной гибели клеток
- PD-L1 – лиганд белка запрограммированной гибели клеток
- sPD-1 – растворимая форма мембранного белка запрограммированной

гибели клеток

sPD-L1 – растворима форма трансмембранного белка запрограммированной

гибели клеток

SPSS Statistics — компьютерная программа для статистической обработки

Данных

TIL – опухоль инфильтрирующие лимфоциты

TNM – международная классификация стадий злокачественных

новообразований

VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брага, Э.А. Молекулярные механизмы в метастазировании рака яичников: ключевые гены и регуляторные микроРНК / Э.А. Брага, М.В. Фридман, Н.Е. Кушлински // Биохимия. – 2017. – Т.82, №5. – С. 717-731.
2. Герштейн, Е.С., Растворимые формы рецептора контрольной точки иммунитета PD-1 и его лиганда PD-L1 в плазме крови больных новообразованиями яичников / Е.С. Герштейн, Д.О. Уткин, И.О. Горячева и др. // Альманах клинической медицины. – 2018. – Т.46, №7. – С.690-698.
3. Заридзе, Д.Г. Динамика заболеваемости злокачественными новообразованиями и смертности от них в России / Д.Г. Заридзе, А.Д. Каприн, И.С. Стилиди // Вопросы онкологии. – 2018. – Т. 64. – №5. – С. 578-591.
4. Каприн, А.Д. Злокачественные новообразования женских половых органов в России: ситуация и проблемы / А.Д. Каприн // Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева. – 2014. – Т.1, №2. – С. 44-47.
5. Коломиец, Л.А. Оптимизация современных подходов в лечении гинекологического рака основных локализаций / Л.А. Коломиец, А.Л. Чернышова, О.Н. Чуруксаева и др. // Злокачественные опухоли. – 2017. – № 7. – С. 66-72.
6. Кушлинский, Н.Е. Основные компоненты сигнального пути контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в плазме крови больных раком и доброкачественными опухолями яичников: клинико-морфологические корреляции / Н.Е. Кушлинский, Е.С. Герштейн, Д.О. Уткин и др. // Акушерство и гинекология. – 2020, №6. – С. 80-88.
7. Кушлинский, Н.Е. Новые микроРНК как потенциальные регуляторы контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1, и прогностический потенциал метилирования MIR9-1 и MIR124-2 при раке яичников / Н.Е. Кушлинский, В.И. Логинов, Д.О. Уткин и др. // Молекулярная биология. – 2020. – Т.54, № 6. – С. 990-996.

8. Кушлинский, Н.Е. Рак яичников: фундаментальные и клинические исследования: монография / Н.Е. Кушлинский, И.С. Стилиди, Н.А. Огнерубов. – М.: Проспект, 2021. – 752 с.
9. Максимов, С.Я. Циторедуктивные операции в онкогинекологии / С.Я. Максимов, И.В. Соболев, А.С. Хаджимба и др. // Практическая онкология. – 2016. – Т.17, № 3. – С. 184-199.
10. Нечушкина, В.М. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака тела матки и сарком матки / В.М. Нечушкина, Л.А. Коломиец, О.А. Кравец и др. // Злокачественные опухоли. – 2021, №11. – С. 218-232.
11. Нечушкина, В.М. Хирургическое лечение рака яичников ранних стадий / В.М. Нечушкина, К.Ю. Морхов, З.Т. Абдурагимова и др. // Современная Онкология. – 2018. – Т.20, №2. – С. 61-65.
12. Тюляндин, С.А. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака яичников, первичного рака брюшины и рака маточных труб / А.С. Тюляндина, Л.А. Коломиец, К.Ю. Морхов и др. // Злокачественные опухоли. – 2019, №9. – С. 164-176.
13. Тюляндин, С.А. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака яичников, первичного рака брюшины и рака маточных труб / А.С. Тюляндина, Л.А. Коломиец, К.Ю. Морхов и др. // Злокачественные опухоли. – 2021, №11. – С. 158-171.
14. Уткин, Д.О. Содержание контрольных точек иммунитета sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных раком яичников / Д.О. Уткин, Е.А. Короткова, Н.А. Петрикова и др. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2020. – Т. 23, №5. – С. 30-36.
15. Чикина, А.С. Метастазирование: клеточные механизмы и их регуляция / А.С. Чикина, А.Ю. Александрова // Мол. Биол. – 2014. – Т.48, № 2. – С. 195-195.
16. Aaberg, M.T. Pembrolizumab administration associated with posterior uveitis / M.T. Aaberg, T.M. Aaberg // Retinal Cases and Brief Reports. – 2017. – Vol.

11, №4. – P. 348-351.

17. Aghajanian, C. Final overall survival and safety analysis of OCEANS, a phase 3 trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer / C. Aghajanian, B. Goff, L.R. Nycum [et al.] // *Gynecol. Oncol.* – 2015. – Vol.139, №1. – P. 10-16.

18. Ahmed, I. Altered expression pattern of circular RNAs in primary and metastatic sites of epithelial ovarian carcinoma / I. Ahmed, T. Karedath, S.S. Andrews [et al.] // *Oncotarget.* – 2016. – Vol.7, №24. – P. 36366.

19. Alberts, D.S. Intraperitoneal Cisplatin plus Intravenous Cyclophosphamide versus Intravenous Cisplatin plus Intravenous Cyclophosphamide for Stage III Ovarian Cancer / D.S. Alberts, P.Y. Liu, E.V.Hannigan [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 1996. – Vol.335, №26. – P. 1950-1955.

20. Apolo, A.B. Avelumab, an anti-programmed death-ligand 1 antibody, in patients with refractory metastatic urothelial carcinoma: results from a multicenter, phase ib study / A.B. Apolo, J.R. Infante, A. Balmanoukian [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2017. – Vol.35, №19. – P. 2117.

21. Arasanz, H. PD1 signal transduction pathways in T cells / H. Arasanz, M. Gato-Canas, M. Zuazo [et al.] // *Oncotarget.* – 2017. – Vol.8, №31. – P. 51936.

22. Armstrong, D.K. Intraperitoneal Cisplatin and Paclitaxel in Ovarian Cancer / D.K. Armstrong, B. Bundy, L. Wenzel [et al.] // *Engl. J. Med.* – 2006. – Vol.354, №1. – P. 34-43.

23. Armstrong, D.K. NCCN guidelines insights: ovarian cancer, version 1.2019: featured updates to the NCCN guidelines / D.K. Armstrong, R.D. Alvarez, J.N. Bakkum-Gamez [et al.] // *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* – 2019. – Vol.17, №8. – P. 896-909.

24. Armstrong, D.K. Ovarian cancer, version 2.2020, NCCN clinical practice guidelines in oncology / D.K. Armstrong, R.D. Alvarez, J.N. Bakkum-Gamez [et al.] // *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* – 2021. – Vol.19, №2. – P. 191-226.

25. Artamonova, E.V. Olaparib in the maintenance treatment of platinum-

sensitive relapse of BRCA mutant ovarian cancer in routine clinical practice: first results of observational study in Russian patients / E.V. Artamonova, E.I. Kovalenco, A.V. Snegovoy [et al.] // *J. Mod. Oncol.* – 2018. – Vol.20, №3. – P. 19-25.

26. Ascierto, P.A. 2015: the year of anti-PD-1/PD-L1s against melanoma and beyond / P.A. Ascierto, F.M. Marincola // *EBioMedicine.* – 2015. – Vol.2, №2. – P. 92-93.

27. Augoff, K. miR-31 and its host gene lncRNA LOC554202 are regulated by promoter hypermethylation in triple-negative breast cancer / K. Augoff, B. McCue, E.F. Plow [et al.] // *Mol. Cancer.* – 2012. – Vol.11, №1. – P. 1-13.

28. Banno, K. Application of microRNA in diagnosis and treatment of ovarian cancer / K. Banno, M. Yanokura, M. Iida [et al.] // *Biomed. Res. Int.* – 2014. – P. 1-6.

29. Baptista, M.Z. Prognostic significance of PD-L1 and PD-L2 in breast cancer / M.Z. Baptista, L.O. Sarian, S.F. Derchain [et al.] // *Human Pathol.* – 2016. – Vol.47, №1. – P. 78-84.

30. Barbolina, M.V. Molecular mechanisms regulating organ-specific metastases in epithelial ovarian carcinoma / M.V. Barbolina // *Cancers.* – 2018. – Vol.10, №11. – P. 444.

31. Belotti, D. Vascular endothelial growth factor stimulates organ-specific host matrix metalloproteinase-9 expression and ovarian cancer invasion / D. Belotti, C. Calcagno, A. Garofalo [et al.] // *Mol. Cancer Res.* – 2008. – Vol. 6, №4. – P. 525-534.

32. Bentivegna, E. Fertility-sparing surgery in epithelial ovarian cancer: A systematic review of oncological issues / E. Bentivegna, S. Gouy, A. Maulard [et al.] // *Ann. Oncol.* – 2016. – Vol.27, №11. – P. 1994-2004.

33. Bergamini, A. Different patterns of disease spread between advanced-stage type I and II epithelial ovarian cancer / A. Bergamini, M. Candiani, G. Taccagni [et al.] // *Gynecol. Obstet. Invest.* – 2016. – 81 (1). – P. 10-14.

34. Bois, A.D. A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer / A.D. Bois, H.J. Lück, W. Meier [et al.] // *J. Nat. Cancer.* – 2003. – Vol.95, №17. – P.1320-1329.

35. Bracken, C.P. A network-biology perspective of microRNA function and dysfunction in cancer / C.P. Bracken, H.S. Scott, G.J. Goodall // *Nat. Rev. Genet.* – 2016. – Vol.17, №12. – P. 719-732
36. Braga, E.A. Molecular mechanisms of ovarian carcinoma metastasis: Key genes and regulatory microRNAs / E.A. Braga, M.V. Fridman, N.E. Kushlinskii // *Biochemistry (Moscow)*. – 2017. – Vol.82, №5. – P. 529-541.
37. Braga, EA. LncRNAs in ovarian cancer progression, metastasis, and main pathways: ceRNA and alternative mechanisms / E.A. Braga, M.V. Fridman, A.A. Moscovtsev [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol.21, №22. – P. 8855.
38. Bryant, H.E. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase / H.E. Bryant, N. Schultz, H.D. Thomas [et al.] // *Nature*. – 2005. – 434 (7035). – P. 913–917.
39. Burger, R.A. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer / R.A. Burger, M.F. Brady, M.A. Bookman [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2011. – No1.365, №26. – P. 2473-2483
40. Burger, R.A. Phase III trial of bevacizumab (BEV) in the primary treatment of advanced epithelial ovarian cancer (EOC), primary peritoneal cancer (PPC), or fallopian tube cancer (FTC): A Gynecologic Oncology Group study / R.A. Burger, M.F. Brady, M.A. Bookman [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2010. – Vol.28, №18. – P. 1342-1351.
41. Burnet, F.M. The concept of immunological surveillance / F.M. Burnet // *Immunological Aspects of Neoplasia*. – 1970, №13. – P. 1-27.
42. Butte, M.J. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses / M.J. Butte, M.E. Keir., T.B. Phamduy // *Immunity*. – 2007. – Vol.27, №1. – P. 111-122.
43. Calin, G.A. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia / G.A. Calin, C.D. Dumitru, M. Shimizu [et al.] // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 2002. – Vol.99, №24. – P. 15524-15529.
44. Cao, J. miR-335 represents an invasion suppressor gene in ovarian cancer

by targeting Bcl-w / J. Cao, J. Cai, D. Huang [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2013. – Vol.30, №2. – P. 701-706.

45. Ceeraz, S. B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease / S. Ceeraz, E. C. Nowak, R. J. Noelle // *Trends Immunol.* – 2013. – Vol.34, №11. – P. 556-563.

46. Chakravarti, N. Predictive factors of activity of anti-programmed death-1/programmed death ligand-1 drugs: immunohistochemistry analysis / N. Chakravarti, V.G. Prieto // *Transl. Lung Cancer Res.* – 2015. – Vol.4, №6. – P. 743 – 751.

47. Chaluvally-Raghavan, P. Direct upregulation of STAT3 by microRNA-551b-3p deregulates growth and metastasis of ovarian cancer / P. Chaluvally-Raghavan, K.J. Jeong, S. Pradeep [et al.] // *Cell Rep.* – 2016. – Vol.15, №7. – P. 1493-1504.

48. Chang, R.K. MicroRNA expression profiles in non-epithelial ovarian tumors / R.K. Chang, X. Li, N. Mu [et al.] // *Int. J. Oncol.* – 2018. – Vol.52, №1. – P. 55-66.

49. Chatterjee J. Clinical use of programmed cell death-1 and its ligand expression as discriminatory and predictive markers in ovarian cancer / J. Chatterjee // *Clin. Cancer Res.* – 2017. – Vol.23, №13. – P. 3453-3460.

50. Chen, D. MicroRNA-200c overexpression inhibits tumorigenicity and metastasis of CD117+CD44+ ovarian cancer stem cells by regulating epithelial-mesenchymal transition / D. Chen, Y. Zhang, J. Wang [et al.] // *J. Ovarian Res.* – 2013. – Vol.6, №1. – P. 1-11.

51. Chen, L. Epithelial carcinoma of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: Incidence and risk factors / L. Chen, J. S. Berek // *UpToDate.* – 2020.

52. Chen, S. Mechanisms Controlling MicroRNA Expression in Tumor / S. Chen, Y. Wang, D. Li [et al.] // *Cells.* – 2022. – Vol.11, №18. – P. 2852.

53. Chen, S. MicroRNA-490-3P targets CDK1 and inhibits ovarian epithelial carcinoma tumorigenesis and progression / S. Chen, X. Chen, Y.L. Xiu [et al.] // *Cancer Lett.* – 2015. – Vol.362, №1. – P. 122-130.

54. Chen, Y. Candidate microRNA biomarkers in human epithelial ovarian

cancer: systematic review profiling studies and experimental validation / Y. Chen, L. Zhang, Q. Hao // *Cancer Cell Int.* – 2013. – Vol.13, №1. – P. 1-8.

55. Chien, J. Ovarian cancer prevention, screening, and early detection: report from the 11th biennial ovarian cancer research symposium / J. Chien, E.M. Poole // *Int. J. Gynecol. Cancer.* – 2017. – Vol.27(9S Suppl 5). – S20-S22.

56. Clamp, A.R. Weekly dose-dense chemotherapy in first-line epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer treatment (ICON8): overall survival results from an open-label, randomised, controlled, phase 3 trial / A.R. Clamp, E.C. James, I.A. McNeish [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2019. – Vol.394, №10214. – P. 178-190.

57. Coalition, W.O.C. The world ovarian cancer coalition atlas / W.O.C. Coalition // *Global Trends In Incidence, Mortality, and Survival.* – 2018.

58. Cobb, L.P. Treatment of rare epithelial ovarian tumors / L.P. Cobb, D.M. Gershenson // *Hematol. Oncol. Clin.* – 2018. – Vol.32, №6. – P. 1011-1024.

59. Cordero, F. Differentially methylated microRNAs in prediagnostic samples of subjects who developed breast cancer in the European Prospective Investigation into Nutrition and Cancer (EPIC-Italy) cohort / F. Cordero, G. Ferrero, S. Polidoro [et al.] // *Carcinogenesis.* – 2015. – Vol.36, №10. – P. 1144-1153

60. Cotliar, J. Pembrolizumab-associated sarcoidosis / J. Cotliar, C. Querfeld, W.J. Boswell [et al.] // *JAAD case reports.* – 2016. – Vol.2, №4. – P. 290-293.

61. Coulie, P.G. van der Bruggen Petal / P.G. Coulie, B.J. van der Bruggen // *Tumour antigens recognized by T lymphocytes: At the core of cancer immunotherapy.* *Nat. Rev. Cancer.* – 2014. – Vol.14, №2. – P. 135-146.

62. Crane, C.A. PI (3) kinase is associated with a mechanism of immunoresistance in breast and prostate cancer / C.A. Crane, A. Panner, J.C. Murray [et al.] // *Oncogene.* – 2009. – Vol.28, №2. – P. 306-312.

63. Croce, C.M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer / C.M. Croce // *Nat. Rev. Genet.* – 2009. – Vol.10, №10. – P. 704-714.

64. Dai, C. MiR-206 inhibits epithelial ovarian cancer cells growth and

invasion via blocking c-Met/AKT/mTOR signaling pathway / C. Dai, Y. Xie, X. Zhuang [et al.] // *Biomed. Pharmacother.* – 2018, №104. – P. 763-770.

65. Deneberg, S. microRNA-34b/c on chromosome 11q23 is aberrantly methylated in chronic lymphocytic leukemia / S. Deneberg, M. Kanduri, D. Alie [et al.] // *Epigenetics.* – 2014. – Vol.9, №6. – P. 910-917.

66. Doherty, P.C. H-2 compatibility is required for T-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus / P.C. Doherty, R.M. Zinkernagel // *J. Exp. Med.* – 1975. – Vol.141, №2. – P. 502-507.

67. Dong, H. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion / H. Dong, G. Zhu, K. Tamada [et al.] // *Nat. Med.* – 1999. – Vol.5, №12. – P. 1365-1369.

68. Drakes, M.L. Stratification of ovarian tumor pathology by expression of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand-1 (PD-L1) in ovarian cancer / M.L. Drakes // *J. Ovarian Res.* – 2018. – Vol.11, №1. – P. 1-11.

69. Eaton, S.L. Total protein analysis as a reliable loading control for quantitative fluorescent Western blotting / S.L. Eaton, S.L. Roche, M. Llaverro Hurtado [et al.] // *PloS One.* – 2013. – Vol.8, №8. – P. e72457

70. Eitan, R. Tumor microRNA expression patterns associated with resistance to platinum based chemotherapy and survival in ovarian cancer patients / R. Eitan, M. Kushnir, G. Lithwick-Yanai et al. // *Gynecol. Oncol.* – 2009. – Vol.114, №2. – P. 253-259.

71. Esquela, K.A. Oncomirs miRNAs with a role in cancer / K.A. Esquela, F.J. Slack. // *Nat. Rev. Cancer.* – 2006. – Vol.6, №4. – P. 259-569.

72. Esteller, M. Non-coding RNAs in human disease / M. Esteller // *Nat. Rev. Genet.* – 2011. – Vol.12, №12. – P. 861-874.

73. Evers, B. Selective inhibition of BRCA2-deficient mammary tumor cell growth by AZD2281 and cisplatin / B. Evers, R. Drost, E. Schut [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2008. – Vol.14, №12. – P. 3916-3925.

74. Feinberg, A.P. The history of cancer epigenetics / A.P. Feinberg, B. Tycko

// Nat. Rev. Cancer. – 2004. – Vol.4, №2. – P. 143-153.

75. Feng, S. MiR-25 promotes ovarian cancer proliferation and motility by targeting LATS2 / S. Feng, W. Pan, Y. Jin [et al.] // Tumor Biol. – 2014. – Vol.35, №12. – P. 12339-12344.

76. Fife, B.T. The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance / B.T. Fife, K.E. Pauken // Ann. N Y Acad. Sci. – 2011. – Vol.1217, №1. – P. 45-59.

77. Finnegan, E.F. MicroRNA biogenesis: regulating the regulators / E.F. Finnegan, A.E. Pasquinelli // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. – 2013. – Vol.48, №1. – P. 51-68.

78. Fong, P.C. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers / P.C. Fong, D.S. Boss, T.A. Yap [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2009. – Vol.36, №2. – P. 123–134.

79. Francisco, L.M. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity / L.M. Francisco, P.T. Sage, A.H. Sharpe // Immunol. Rev. – 2010. – Vol.236, №1. – P. 219-242.

80. Fu, X. MicroRNA-613 inhibited ovarian cancer cell proliferation and invasion by regulating KRAS / X. Fu, Y. Cui, S. Yang [et al.] // Tumor Biology. – 2016. – Vol.37, №5. – P. 6477-6483.

81. Gao, J. MicroRNA-142-3p inhibits cell proliferation and chemoresistance in ovarian cancer via targeting sirtuin 1 / J. Gao, N. Wu, X. Liu [et al.] // Exp. Ther. Med. – 2018. – Vol.15, №6. – P. 5205-5214.

82. Garrido, F. Generation of MHC class I diversity in primary tumors and selection of the malignant phenotype / F. Garrido, I. Romero, N. Aptsiauri [et al.] // Int. J. Cancer. – 2016. – Vol.138, №2. – P. 271-280.

83. Gershenson, D. M. Contemporary primary treatment of women with stage II-IV low-grade serous ovarian/peritoneal cancer (LGSOC): Determinants of relapse and disease-free survival / D.M. Gershenson, L.P. Cobb, S.N. Westin [et al.] // Gynecol. Oncol. – 2022. – Vol.167, №2. – P. 139-145.

84. Ghafouri-Fard, S. miRNA profile in ovarian cancer / S. Ghafouri-Fard, H. Shoorei, M. Taheri // *Exp. Mol. Pathol.* – 2020, №113. – P. 104381.
85. Ghebeh, H. et al. Expression of B7-H1 in breast cancer patients is strongly associated with high proliferative Ki-67 expressing tumor cells / H. Ghebeh, A. Tulbah, S. Mohammed [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 2007. – Vol.121, №4. – P. 751-758.
86. Goldberg, S.B. Pembrolizumab for patients with melanoma or non-small-cell lung cancer and untreated brain metastases: early analysis of a non-randomised, open-label, phase 2-trial / S.B. Goldberg, S.N. Gettinger, A. Mahajan [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2016. – Vol.17, №7. – P. 976-983.
87. Gong, A.Y. MicroRNA-513 regulates B7-H1 translation and is involved in IFN- γ -induced B7-H1 expression in cholangiocytes / A.Y. Gong, R. Zhou, G. Hu [et al.] // *J. Immunol.* – 2009. – Vol.82, №3. – P. 1325-1333.
88. Gulyaeva, L.F. Regulatory mechanisms of microRNA expression / L.F. Gulyaeva, N.E. Kushlinskiy // *J. Transl. Med.* – 2016. – Vol.14, №1. – P. 1-10.
89. Halvorsen, A.R. Evaluation of prognostic and predictive significance of circulating microRNAs in ovarian cancer patients / A.R. Halvorsen, G. Kristensen, A. Embleton [et al.] // *Disease Markers.* – 2017. – P. 1-9.
90. Han, S. miR-144 potentially suppresses proliferation and migration of ovarian cancer cells by targeting RUNX1 / S. Han, J. Zhu, Y. Zhang // *Med. Sci. Monit. Basic Res.* – 2018, №24. – P. 40-46.
91. Heine, A. Successful treatment of refractory leiomyosarcoma with the PD-1 inhibitor nivolumab / A. Heine, G. Kristiansen, H.H. Schild [et al.] // *Ann. Oncol.* – 2016. – Vol.27, №9. – P. 1813-1814.
92. Ishida, Y. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death / Y. Ishida, Y. Agata, K. Shibahara et al. // *The EMBO J.* – 1992. – Vol.11, №11. – P. 3887-3895.
93. Jayson, G. Ovarian cancer / G.C. Jayson, E.C. Kohn, H.C. Kitchener et al. // *Lancet.* – 2014. – Vol.384, №9951. – P. 1376-1388.
94. Jiménez-Wences, H. Methylation and expression of miRNAs in

precancerous lesions and cervical cancer with HPV16 infection / H. Jiménez-Wences, D. N. Martínez-Carrillo, O. Peralta-Zaragoza [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2016. – Vol.35, №4. – P. 2297-2305.

95. Katsumata, N. Long-term results of dose-dense paclitaxel and carboplatin versus conventional paclitaxel and carboplatin for treatment of advanced epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer (JGOG 3016): A randomised, controlled, open-label trial / N. Katsumata, M. Yasuda, S. Isonishi [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2013. – Vol.4, №10. – P. 1020-1026.

96. Kaufman, H.L. Avelumab in patients with chemotherapy-refractory metastatic Merkel cell carcinoma: a multicentre, single-group, open-label, phase 2 trial / H.L. Kaufman, J. Russel, O. Hamid [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2016. – Vol.17, №10. – P. 1374-1385.

97. Kehoe, S. Primary chemotherapy versus primary surgery for newly diagnosed advanced ovarian cancer (CHORUS): an open-label, randomised, controlled, non-inferiority trial / S. Kehoe, J. Hook, M. Nankivell [et al.] // *Lancet.* – 2015. – Vol.386(9990). – P. 249-257.

98. Keir, M. E. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance / M. E. Keir, S. C. Liang, I. Guleria [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2006. – Vol.203, №4. – P. 883-895.

99. Keir, M.E. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity / M.E. Keir, M.J. Butte, G.J. Freeman [et al.] // *Ann. Rev. Immunol.* – 2008, №26. – P. 677 – 704.

100. Kim, T.H. Deregulation of miR-519a, 153, and 485-5p and its clinicopathological relevance in ovarian epithelial tumours / T.H. Kim, Y.K. Kim, Y. Kwon [et al.] // *Histopathology.* – 2010. – Vol.57, №5. – P. 734-743.

101. Kinose, Y. The role of microRNAs in ovarian cancer / Y. Kinose, K. Sawada, K. Nakamura, T. Kimura // *BioMed Res. Int.* – 2014. – 2014: 249393.

102. Kirchberger, M.C. Combined low-dose ipilimumab and pembrolizumab after sequential ipilimumab and pembrolizumab failure in advanced melanoma / M.C. Kirchberger, A. Hauschild, G. Schuler [et al.] // *Eur. J. cancer.* – 2016, №65. – P. 182-

184.

103. Kunej, T. Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: an integrated review of literature / T. Kunej // *Mut. Res.* – 2011. – Vol.717, №1-2. – P. 77-84.

104. Kuol, N. PD-1/PD-L1 in disease / N. Kuol, L. Stojanovska, K. Nurgali [et al.] // *Immunotherapy.* – 2018. – Vol.10, №2. – P. 149-160.

105. Kurman, R.J., World Health Organisation classification of tumours of the female reproductive organs / R.J. Kurman, M.L. Carcangiu, C.S. Herrington // *International Agency for Research on Cancer.* – 2014. – P. 6.

106. Lastwika, K.J. Control of PD-L1 Expression by Oncogenic Activation of the AKT–mTOR Pathway in Non–Small Cell Lung CancerControl of PD-L1 by Oncogenic Activation of AKT/mTOR in NSCLC / K.J. Lastwika, W. Wilson, Q.K. Li [et al.] // *Cancer Res.* – 2016. – Vol.76, №2. – P. 227-238.

107. Latchman, Y. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation / Y. Latchman, C.R. Wood, T. Chernova [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2001. – Vol.2, №3. – P. 261-268.

108. Ledermann, J.A. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up / J.A. Ledermann, F.A. Raja, C. Fotopoulou [et al.] // *Ann. Oncol.* – 2013. – Suppl 6. – vi24-32.

109. Ledermann, J.A. Overall survival (OS) in patients (pts) with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer (PSR SOC) receiving olaparib maintenance monotherapy: An interim analysis / J.A. Lederman, P. Harter, C. Ghourley [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2016. – Vol.34, №15. – P. 5501.

110. Leng, R. MiR-718 represses VEGF and inhibits ovarian cancer cell progression / R. Leng, L. Zha, L. Tang // *FEBS Lett.* – 2014. – Vol.588, №12. – P. 2078-2086.

111. Leung, J. The CD28-B7 family in anti-tumor immunity: emerging concepts in cancer immunotherapy / J. Leung, W.K. Suh // *Immune Netw.* – 2014. – Vol.14, №6. – P. 265-276.

112. Li, C. miR-320 inhibited ovarian cancer oncogenicity via targeting TWIST1 expression / C. Li, P. Duan, J. Wang [et al.] // *Am. J. Transl. Res.* – 2017. – Vol.9, №8. – P. 3705-3713.
113. Li, P. MicroRNA-340 induces apoptosis and inhibits metastasis of ovarian cancer cells by inactivation of NF- κ B1 / P. Li., Y. Sun, Q. Liu // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2016. – Vol.38, №5. – P. 1915-1927.
114. Li, Z. MicroRNAs from plants to animals, do they define a new messenger for communication? / Z. Li, R. Xu, N. Li. // *Nutr. Metab. (Lond)* – 2018. – Vol.15, №1. – P. 1-21.
115. Lin, Y. MicroRNA-215 targets NOB1 and inhibits growth and invasion of epithelial ovarian cancer / Y. Lin, Y. Jin, T. Xu [et al.] // *Am. J. Trans. Res.* – 2017. – Vol.9, №2. – P. 466-477.
116. Liu, J. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- γ and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway / J. Liu, A. Hamrouni, D. Wolowiec [et al.] // *Blood.* – 2007. – Vol.110, №1. – P. 296-304.
117. Loginov, V.I. Methylation of miRNA genes and oncogenesis / V.I. Loginov // *Biochemistry (Moscow)*. – 2015, №80. – P. 145-162.
118. Loginov, V.I. Novel miRNA genes deregulated by aberrant methylation in ovarian carcinoma are involved in metastasis / V.I. Loginov, I.V. Pronina, A.M. Burdenny [et al.] // *Gene.* – 2018, №662. – P. 28–36.
119. Lopez-Serra, P. DNA methylation-associated silencing of tumor-suppressor microRNAs in cancer / P. Lopez-Serra, M. Esteller // *Oncogene.* – 2012. – Vol.31, №13. – P. 1609-1622.
120. Mahoney, K.M. PD-L1 Antibodies to Its Cytoplasmic Domain Most Clearly Delineate Cell Membranes in Immunohistochemical Staining of Tumor Cells Immunohistochemical Detection of Membrane PD-L1 / K.M. Mahoney, H. Sun, X. Liao [et al.] // *Cancer Immunol. Res.* – 2015. – Vol.3, №12. – P. 1308-1315.
121. Mallen, A. Surgical prevention strategies in ovarian cancer / A. Mallen,

T.R. Soong, M.K. Townsend [et al.] // *Gynecol. Oncol.* – 2018. – Vol.151, №1. – P. 166-175.

122. Mandai, M. PD-1/PD-L1 blockage in cancer treatment – From basic research to clinical application / M. Mandai // *Int. J. Clin. Oncology.* – 2016. – Vol.21, №3. – P. 447-447.

123. Markham, A. Alpelisib: first global approval / A. Markham // *Drugs.* – 2019. – Vol.79, №11. – P. 1249-1253.

124. Markman, M. Phase III trial of standard-dose intravenous cisplatin plus paclitaxel versus moderately high-dose carboplatin followed by intravenous paclitaxel and intraperitoneal cisplatin in small-volume stage III ovarian carcinoma: An intergroup study of the gynecol / M. Markman, B.N. Bundy, D.S. Alberts [et al.] // *Journal of Clinical Oncology.* – 2001. – Vol.19, №4. – P.1001-1007

125. Martin-Liberal, J. Anti-programmed cell death-1 therapy and insulin-dependent diabetes: a case report / J. Martin-Liberal, A.J. Furness, K. Joshi [et al.] // *Cancer Immunology, Immunotherapy.* – 2015. – Vol.64, №6. – P. 765-767.

126. Mazel, M. Frequent expression of PD-L1 on circulating breast cancer cells / M. Mazel, W. Jacot, K. Pantel [et al.] // *Molecular oncology.* – 2015. – Vol.9, №9. – P. 1773-1782.

127. McGuire, W.P. Cyclophosphamide and Cisplatin Compared with Paclitaxel and Cisplatin in Patients with Stage III and Stage IV Ovarian Cancer / W.P. McGuire, W.J. Hoskins, M.F. Brady [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 1996. – Vol.334, №1. – P. 1-6.

128. Moukarzel, L.A. Posterior pelvic exenteration, a crucial component in the surgeon's toolbox for optimizing surgical cytoreduction for advanced ovarian cancer / L.A. Moukarzel, D.S. Chi // *J. Gynecol. Oncol.* – 2022. – Vol.33, №3. – p.41.

129. Muenst, S. Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer / S. Muent, A. R. Schaeerli, F. Gao [et al.] // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2014. – Vol.146, №1. – P. 15-24.

130. Muinao, T. Diagnostic and Prognostic Biomarkers in ovarian cancer and the potential roles of cancer stem cells—An updated review / T. Muinao, H.P.D. Boruah,

M. Pal // *Exp. Cell Res.* – 2018. – Vol.362, №1. – P. 1-10.

131. Nam, E.J. MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma / E.F. Nam, H. Yoon, S.W. Kim [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2008. – Vol.14, №9. – P. 2690-2695.

132. Necchi, A. Atezolizumab in platinum-treated locally advanced or metastatic urothelial carcinoma: post-progression outcomes from the phase II IMvigor210 study / A. Necchi, R.W. Joseph, Y. Loriot [et al.] // *Ann. Oncol.* – 2017. – Vol.28, №12. – P. 3044-3050.

133. Nguyen, V.H.L. The role of microRNAs in epithelial ovarian cancer metastasis / V.H.L. Nguyen, C. Yue, K.Y. Du [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol.21, №19. – P. 7093.

134. Nishimura, H. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor / H. Nishimura, M. Nose, H. Hiai [et al.] // *Immunity.* – 1999. – Vol.11, №2. – P. 141-151.

135. Okazaki, T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application / T.Okazaki, T. Honjo // *Int. Immunol.* – 2007. – Vol.19, №7. – P. 813-824.

136. Oppel-Heuchel, H. Therapy monitoring and management of adverse events in PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibition / H. Oppel-Heuchel, M.O. Grimm // *Der Urologe. Ausg. A.* – 2016. – Vol.55, №5. – P. 677-690.

137. Orr, B. Diagnosis and Treatment of Ovarian Cancer / B. Orr, R.P. Edwards // *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* – 2018. – Vol.32, №6. – P. 943-964.

138. Ozols, R.F. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: A Gynecologic Oncology Group study / R.F. Ozols, B.N. Bundy, B.E. Greer [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2003. – Vol.21, №17. – P. 3194-3200.

139. Patel, J.N. Differences in pharmacology, toxicities key to clinical use of PARP inhibitors / P. Murthy, F. Muggia // *Hem Onc Today.* – 2018. – March. – 10.

140. Perren, T.J. A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer / T.J. Perren,

A.M. Swart, J. Pfisterer [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2011. – Vol.365, №26. – P. 2484-2496.

141. Piccart, M.J. Randomized intergroup trial of cisplatin-paclitaxel versus cisplatin- cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: Three-year results / M.J. Piccart, K. Bertelsen, K. James [et al.] // *J. Natl. Cancer Ins.* – 2000. – Vol.92, №9. – P. 699-708.

142. Pignata, S. Carboplatin plus paclitaxel once a week versus every 3 weeks in patients with advanced ovarian cancer (MITO-7): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial / S. Pignata, G. Scambia, D. Katsaros [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2014. – Vol.15, №4. – P. 396-405.

143. Piletič, K. MicroRNA epigenetic signatures in human disease / K. Piletič, T. Kunej // *Arch. Toxicol.* – 2016. – Vol.9, №10. – P. 2405-2419.

144. Pinto, R. DNA methylation and miRNAs regulation in hereditary breast cancer: epigenetic changes, players in transcriptional and post-transcriptional regulation in hereditary breast cancer / R. Pinto, S. De Summa, B. Pilato [et al.] // *Curr. Mol. Med.* – 2014. – Vol.14, №1. – P. 45-57.

145. Poveda, A. Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a final analysis of a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial / A. Poveda, E. Pujade-Lauraine, J.A. Ledermann [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2021. – Vol.22, №5. – P. 620-631.

146. Prahm, K.P. Identification and validation of potential prognostic and predictive miRNAs of epithelial ovarian cancer / K.P. Prahm, C. Høgdall, M.A. Karlsen [et al.] // *PLoS One.* – 2018. – Vol.13, №11. – P. 1-18

147. Prat, J. FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: abridged republication / J. Prat // *J. Gynecol. Oncol.* – 2015, №26. – P. 87-89.

148. Pronina, I.V. DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer-associated microRNAs and breast cancer progression / I.V. Pronina, V.I. Loginov, A.M.

Burdenny et al. // *Gene*. – 2017. – Vol.604. – P. 1-8.

149. Qin, J. Downregulation of microRNA-132 by DNA hypermethylation is associated with cell invasion in colorectal cancer / J. Qin, J. Ke, J. Xu [et al.] // *OncoTargets Ther.* – 2015. – Vol.8. – P. 3639.

150. Qin, W. MicroRNA-152 inhibits ovarian cancer cell proliferation and migration and may infer improved outcomes in ovarian cancer through targeting FOXP1 / W. Qin, W. Xie, Q. He [et al.] // *Exp. Ther. Med.* – 2018. – Vol.15, №2. – P. 1672-1679.

151. Qu, M. MicroRNA 138 inhibits SOX12 expression and the proliferation, invasion and migration of ovarian cancer cells / M. Qu, Y. Zhu, M. Jin // *Exp. Ther. Med.* – 2018. – Vol.16, №3. – P. 1629-1638

152. Rendi, M.H. Epithelial carcinoma of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: histopathology / M.H. Rendi, R.L. Garcia // *Dizon Available via www.uptodate.com. Published.* – 2016.

153. Resnick, K.E. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform / K. E. Resnick, H. Alder, J. P Hagan [et al.] // *Gynecol. Oncol.* – 2009. – Vol.112, №1. – P. 55-59.

154. Rittmeyer, A. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial / A. Rittmeyer, F. Barlesi, D. Waterkamp [et al.] // *Lancet.* – 2017. – Vol.389(10066). – P. 255-265.

155. Rose, P.G. Secondary Surgical Cytoreduction for Advanced Ovarian Carcinoma / P.G. Rose, S. Nerenstone, M.F. Brady [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2004. – Vol.351, №24. – P. 2489-2497.

156. Rush, S.K. Pathologic findings and clinical outcomes in women undergoing risk-reducing surgery to prevent ovarian and fallopian tube carcinoma: a large prospective single institution experience / S.K. Rush, E.M. Swisher, R.L. Garcia [et al.] // *Gynecol. Oncol.* – 2020. – Vol.157, №2. – P. 514-520.

157. Schalper, K.A. PD-L1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes: revisiting the antitumor immune response potential in breast cancer / K.A. Schalper // *Oncoimmunology*. – 2014. – Vol.3, №6. – P. e29288.
158. Sharpe, A.H. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection / A.H. Sharpe, E.J. Wherry, R. Ahmed [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2007. – Vol.8, №3. – P. 239-245.
159. Shi, M. MicroRNA-200 and microRNA-30 family as prognostic molecular signatures in ovarian cancer: A meta-analysis / M. Shi, Y. Mu, H. Zhang [et al.] // *Medicine*. – 2018. – Vol.97, №32. – P. 1-9.
160. Shin, D.S. Primary Resistance to PD-1 Blockade Mediated by JAK1/2 Mutations Primary Resistance to PD-1 Blockade / D.S. Shin, J.M. Zaretsky, H. Escuin-Ordinas [et al.] // *Cancer Discovery*. – 2017. – Vol.7, №2. – P. 188-201.
161. Siegel, R.L. Cancer statistics, 2019 / R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal // *CA: Cancer J. Clin.* – 2019. – Vol.69, №1. – P. 7-34.
162. Slatnik, C.L. Ovarian cancer: Ensuring early diagnosis / C L. Slatnik, E. Duff // *Nurse Pract.* – 2015. – Vol.40, №9. – P. 47-54.
163. Soong, T.R. Frontiers in the pathology and pathogenesis of ovarian cancer: cancer precursors and "Precursor Escape" / T.R. Soong, D.M. Dinulescu, W. Xian [et al.] // *Hematology/Oncology Clinics of North America*. – 2018. – Vol.32, №6. – P. 915-928.
164. Soong, T.R. The fallopian tube, «precursor escape» and narrowing the knowledge gap to the origins of high-grade serous carcinoma / T.R. Soong, B.E. Howitt, N. Horowitz [et al.] // *Gynecol. Oncol.* – 2019. – Vol.152, №2. – P. 426-433.
165. Spain, L. Acute renal allograft rejection after immune checkpoint inhibitor therapy for metastatic melanoma / L. Spain, R. Higgins, K. Gopalakrishnan [et al.] // *Ann. Oncol.* – 2016. – Vol.27, №6. – P. 1135-1137.
166. Stewart, C. Ovarian cancer: an integrated review / C. Stewart, C. Ralyea, S. Lockwood // *Semin. Oncol. Nurs.* – 2019. – Vol.35, №2. – P. 151-156.
167. Stewart, S.L. The effect of gynecologic oncologist availability on ovarian

cancer mortality / S.L. Stewart, D. Cooney, S. Hirsch [et al.] // *World J. Obstet. Gynecol.* – 2014. – Vol.3, №2. – P. 71-77.

168. Sul, J. FDA approval summary: pembrolizumab for the treatment of patients with metastatic non-small cell lung cancer whose tumors express programmed death-ligand 1 / J. Sul, G.M. Blumenthal, X. Jiang [et al.] // *Oncologist.* – 2016. – Vol.21, №5. – P. 643-650.

169. Sung, H. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel [et al.] // *CA: Cancer J. Clin.* – 2021. – Vol.71, №3. – P. 209-249.

170. Suzuki, H. DNA methylation and cancer pathways in gastrointestinal tumors / H. Suzuki, T. Tokino, Y. Shinomura [et al.] // *Pharmacogenomics.* – 2008. – Vol.9, №12. – P. 1917-1928.

171. Suzuki, H. DNA methylation and microRNA dysregulation in cancer / H. Suzuki, R. Maruyama, E. Yamamoto [et al.] // *Mol. Oncol.* – 2012. – Vol.6, №6. – P. 567-578.

172. Taube, J.M. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape / J.M Taube, R.A. Anders, G.D. Young [et al.] // *Sci. Transl. Med.* – 2012. – Vol.4, №127. – P. 127ra37-127ra37.

173. Taylor, D.D. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer / D.D. Taylor, C. Gercel-Taylor // *Gynecol. Oncol.* – 2008. – Vol.110, №1. – P. 13-21.

174. Teng, Y. miRNA-200a/c as potential biomarker in epithelial ovarian cancer (EOC): evidence based on miRNA meta-signature and clinical investigations / Y. Teng // *Oncotarget.* – 2016. – Vol.7. – №49. – P. 81621.

175. Thomas, L. On immunosurveillance in human cancer / L. Thomas // *Yale J. Biol. Med.* – 1982. – Vol.55, №3-4. – P. 329.

176. Torre, L.A. Ovarian cancer statistics / L.A. Torre, B. Trabert, C.E. DeSantis [et al.] // *CA: Cancer J. Clin.* – 2018. – Vol.68, №4. – P. 284-296.

177. Tsibulak, I. Hopes and failures in front-line ovarian cancer therapy / I. Tsibulak, A.G. Zeimet, C. Marth // In Critical Reviews in Oncology / Hematology. – 2019. – Vol.143. – P. 14-19.

178. van Baal, J.O.A.M. Development of peritoneal carcinomatosis in epithelial ovarian cancer: a review / J.O.A.M. van Baal, C.J.F. van Noorden, R. Nieuwland [et al.] // J. Histochem. Cytochem. – 2018. – Vol.66, №2. – P. 67-83.

179. van der Burg, M.E. The effect of debulking surgery after induction chemotherapy on the prognosis in advanced epithelial ovarian cancer. Gynecological Cancer Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer / M.E. van der Burg, M. van Lent, M. Buyse [et al.] // N. Engl. J. Med. – 1995. – Vol.332, №10. – P. 629-634.

180. van der Burg, M.E. The role of interval debulking surgery in ovarian cancer / M.E van der Burg, I. Vergote // Curr. Oncol. Rep. – 2003. – Vol.5, №6. – P. 473-481.

181. Vargas, A.N. Natural history of ovarian cancer // Ecancermedicalscience. – 2014. – Vol.8 : 465.

182. Vergote, I. Clinical research in ovarian cancer: consensus recommendations from the Gynecologic Cancer InterGroup / I. Vergote, A. Gonzalez-Martin, D. Lorusso, [et al.] // Lancet Oncol. – 2022. – Vol.23, №8. – P. 374-384.

183. Vergote, I. Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIC or IV ovarian cancer / I. Vergote, C. G. Tropé, F. Amant [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2010. – Vol.363, №10. – P. 943-953.

184. Vergote, I. Primary surgery or neoadjuvant chemotherapy followed by interval debulking surgery in advanced ovarian cancer / I. Vergote, F. Amant, G. Kristensen [et al.] // Eur. J. Cancer. – 2011. – Vol.47. – P. S88-S92.

185. Vilming Elgaaen, B. Global miRNA expression analysis of serous and clear cell ovarian carcinomas identifies differentially expressed miRNAs including miR-200c-3p as a prognostic marker / B. Vilming Elgaaen, O.K. Olstad, K.B.F. Haug [et al.] // BMC Cancer. – 2014. – Vol.14, №80. – P. 1471-2407.

186. Vogell, A. Cancer screening in women / A. Vogell, M.L. Evans // Obstet.

Gynecol. Clin. – 2019. – Vol.46, №3. – P. 485-499.

187. Walker, J. A phase III trial of bevacizumab with IV versus IP chemotherapy for ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma: An NRG Oncology Study / J. Walker, M.F. Brady, P.A DiSilvestro [et al.] // Gynecol. Oncol. – 2016. – Vol.365, №26. – P. 2484-2496.

188. Walker, J.L. Society of Gynecologic Oncology recommendations for the prevention of ovarian cancer / J.L. Walker, C.B. Powell, L.M. Chen [et al.] // Cancer. – 2015. – Vol.121, №13. – P. 2108-2120.

189. Webb, P.M. Trends in hormone use and ovarian cancer incidence in US white and Australian women: implications for the future / P.M. Webb, A.C. Green, S.J. Jordan // Cancer Causes & Control. – 2017. – Vol.28. – P. 365-370.

190. Weber, J.S. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial / J.S. Weber, S.P. D'Angelo, D. Minor [et al.] // Lancet Oncol. – 2015. – Vol.16, №4. – P. 375-384.

191. Wee, E.J.H. Mapping the regulatory sequences controlling 93 breast cancer-associated miRNA genes leads to the identification of two functional promoters of the Hsa-mir-200b cluster, methylation of which is associated with metastasis or hormone receptor status in advanced breast cancer / E.J.H. Wee, K. Peters, S.S. Nair [et al.] // Oncogene. – 2012. – Vol.31, №38. – P. 4182-4195.

192. Wen, Z. MicroRNA-148a inhibits migration and invasion of ovarian cancer cells via targeting sphingosine-1-phosphate receptor 1 / Z. Wen, S. Zhao, S. Liu [et al.] // Mol. Med. Rep. – 2015. – Vol.12, №3. – P. 3775-3780.

193. Wimberly, H. Pd-L1 expression correlates with tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer / H. Wimberly, J. R. Brown, K. Schalper et al. // Cancer Immunol. Res. – 2015. – Vol.3, №4. – P. 326-332.

194. Yang, Y. Dramatic response to anti-PD-1 therapy in a patient of squamous cell carcinoma of thymus with multiple lung metastases / Y. Yang, L. Ding, P. Wang //

J. Thor. Dis. – 2016. – Vol.8, №7. – P. E535

195. Yin, H. DNA Methylation mediated down-regulating of MicroRNA-33b and its role in gastric cancer / H. Yin, P. Song, R. Su [et al.] // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol.6, №1. – P. 1-12.

196. Yokoi, A. Integrated extracellular microRNA profiling for ovarian cancer screening / A. Yokoi, J. Matsuzaki, Y. Yamamoto [et al.] // *Nat. Commun.* – 2018. – Vol.9, №1. – P. 1-10.

197. Younes, A. Nivolumab for classical Hodgkin's lymphoma after failure of both autologous stem-cell transplantation and brentuximab vedotin: a multicentre, multicohort, single-arm phase 2 trial / A. Younes, A. Santoro, M. Shipp [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2016. – Vol.17, №9. – P. 1283-1294.

198. Yousefi, Z. Is transvaginal core needle biopsy a safe method in diagnosis of ovarian cancer / Z. Yousefi, M. Frazestanian, B. Davachi [et al.] // *Int. J. Cancer Manag.* – 2018. – Vol.11, №2.

199. Yuan, H. Involvement of MicroRNA-210 demethylation in steroid-associated osteonecrosis of the femoral head / H. Yuan, C.V. Roemeling, C. Changan [et al.] // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol.6, №1. – P. 1-7.

200. Zaretsky, J.M. Mutations associated with acquired resistance to PD-1 blockade in melanoma / J.M. Zaretsky, A. Garcia-Diaz, D. S. Shin [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2016. – Vol.375, №9. – P. 819-829

201. Zhang, H. MiR-124 inhibits the migration and invasion of ovarian cancer cells by targeting SphK1 / H. Zhang, Q. Wang, Q. Zhao [et al.] // *J. Ovarian Res.* – 2013. – Vol.6, №1. – P. 1-9.

202. Zhang, J. Circulating PD-L1 in NSCLC patients and the correlation between the level of PD-L1 expression and the clinical characteristics / J. Zhang, J. Gao, Y. Li [et al.] // *Thorac. Cancer.* – 2015. – Vol.6, №4. – P. 534-538.

203. Zou, J. Downregulation of miR-429 contributes to the development of drug resistance in epithelial ovarian cancer by targeting ZEB1 / J. Zou, L. Liu, Q. Wang [et al.] // *Am. J. Transl. Res.* – 2017. – Vol.9, №3. – P. 1357-1368.